

Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**  
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

**Discipline ou spécialité :**  
PATOGEN

---

**Présentée et soutenue par :**  
Mme Kheira HADJEBA-MEDJDOUB

**le :** mardi 5 juin 2012

**Titre :**  
Risque de multi-contaminations en mycotoxines et moyens de désactivation  
par les parois de levures et levures enrichies en glutathion  
ou sélénométhionine

---

**Ecole doctorale :**  
Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

**Unité de recherche :**  
UMR 5503 Laboratoire de Génie Chimique Biosym

**Directeur(s) de Thèse :**  
Pr annie LESZKOWICZ

**Rapporteurs :**  
Pr Adela LOPEZ DE CERAIN  
Pr Jean Louis MARTY

**Membre(s) du jury :**  
Dr Nathalie BALLET  
Dr Virginie MARQUIS  
Dr Abdellah ZINEDINE

## Remerciements

---

Je tiens avant tout à exprimer ma sincère gratitude au **Pr Annie Leszkowicz**, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire, il y a de nombreuses années. Elle m'a permis de me former à la recherche en débutant par le stage de Master en 2007, puis en me donnant l'opportunité de continuer par un DRU « diplôme de recherche universitaire » en 2008 puis une thèse au sein de son équipe ainsi que de m'avoir aidée à financer ma thèse. Je la remercie pour sa compétence scientifique, sa disponibilité, et ses conseils. Je la remercie de la confiance qu'elle m'a accordée et d'être tout simplement un modèle pour moi.

Je remercie le **Dr Nathalie Ballet** de la société **Lesaffre** sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour. Je la remercie pour la confiance qu'elle a su me témoigner au cours de cette étude. Je lui exprime ma très grande gratitude pour m'avoir permis la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement le **Pr Jean Louis Marty ; Pr Abdellah Zinedine et le Pr Adela Lopez de Cerain** d'avoir acceptés la lourde tâche d'examiner ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je remercie **Dr Virginie Marquis** qui ont bien voulu prêter intérêt à ce travail en acceptant d'en être examinateur.

Je tiens aussi à remercier **Dr Roussos, Dr Claire Albasi, Dr Claire Joannis-Cassan et Dr Marie-Carmen Monje** pour les précieux conseils qu'ils m'ont donnés tout le long de cette étude lors des comités de thèse.

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui j'ai collaboré et sans qui ce travail ne serait pas ce qu'il est. Je remercie **Dr Ivana Polisenska et Dr Vlasta Dohnal** de m'avoir reçu au sein de leur laboratoire (République Tchèque). Merci à l'équipe du **Pr Maja Peraica** (Institut de santé publique, Zagreb, Croatie) et à l'équipe du **Pr Johanna Fink-Gremmels** (en Hollande) pour leur étroite collaboration dans les études *in vivo*. Merci au **Pr Richard Manderville et le Pr Chakib El Adlouni** dans le cadre des études mécanistiques sur les dérivés GSH de l'OTA et la multi-exposition OTA/FB.

Je remercie toutes les personnes que j'ai côtoyées au cours de cette étude, pour leur aide, leur sympathie et leur bonne humeur.

Un merci particulier à **Virginie Marquis et Mariana Fergane** pour m'avoir initiée aux techniques du laboratoire, pour leur aide scientifique et les moments agréables passés ensembles. Merci pour votre gentillesse et votre soutien. Je remercie tous les collègues du laboratoire et toutes les personnes de l'ENSAT que j'ai cotoyés au cours de ma thèse, plus particulièrement, **Patricia, Nicolas, Marion, ...**

Merci à toutes mes stagiaires : **Diana, Dima, Hélène, Quitterie, Stéphanie, Sara, Bouchra** qui m'ont apporté une aide précieuse.

Je remercie également les organismes qui m'ont financé : la **région Midi Pyrénées, l'Association pour la Recherche sur le cancer (ARC), Lesaffre**, pour le soutien financier et leur confiance dans mon travail.

Un grand merci aux personnes, famille et amis, scientifiques ou non qui m'ont soutenue durant toute ma vie.

Enfin, j'adresse à **mes parents et à mes frères (Nounou, Abdelkader et Hassène)** un grand et particulier « merci », qui de loin, mais toujours présents et proches dans mon cœur, ont su m'encourager, me soutenir et de croire en moi. Un énorme merci à mon cher et tendre **époux Adel**, pour tes encouragements, pour ton écoute, et pour tout ce que tu m'apportes. Un petit clin d'œil à ma petite princesse **Dounya-Amélya** qui est arrivée au monde durant ma 1<sup>ère</sup> année de thèse et qui illumine ma vie.

# Sommaire

---

Remerciements .....	2
Liste des figures .....	12
Liste des abréviations.....	20
Publications.....	23
Communications à des congrès internationaux.....	24
Introduction .....	27

## Analyse bibliographique Partie 1 :Les mycotoxines

1. Généralités sur les mycotoxines.....	31
2. L'ochratoxine A (OTA).....	31
2.1 Origine et structure de l'OTA.....	31
2.2 Exposition de l'homme .....	31
2.3 Toxicocinétique.....	33
2.4 Effets toxiques .....	35
2.4.1 Néphrotoxicité.....	35
2.4.2 Cancérogénicité .....	36
2.4.3 Génotoxicité et mutagénicité .....	37
2.4.4 Tératogénicité .....	38
2.5 Effet de l'OTA sur les animaux .....	38
2.5.1 Porcins .....	38
2.5.2 Volailles.....	39
2.5.3 Bovins.....	40
2.5.4 Animaux de compagnie (chat et chien).....	40
3. La zéaralénone (ZEA).....	40
3.1 Origine et structure de la ZEA.....	40
3.2 Exposition de l'homme .....	41
3.3 Toxicocinétique.....	41
3.4 Effets toxiques .....	42
3.4.1 Fixation aux récepteurs œstrogéniques dans les tissus cibles.....	42
3.4.2 Les effets sur les fonctions de reproduction.....	42
3.4.3 Cancérogénicité .....	44
3.4.4 Génotoxicité et mutagénicité .....	44
3.4.5 Tératogénicité .....	44
3.5 Effet de la ZEA sur les animaux .....	45
3.5.1 Porcins .....	45
3.5.2 Bovins.....	46
3.5.3 Animaux de compagnie .....	46
4. La citrinine (CIT).....	46
4.1 Origine et structure de la CIT.....	46
4.2 Exposition de l'homme .....	47
4.3 Toxicocinétique.....	47
4.4 Effets toxiques .....	47
4.4.1 Néphrotoxicité et hépatotoxicité.....	47
4.4.2 Génotoxicité et mutagénicité .....	48
5. La fumonisine B1 (FB <sub>1</sub> ).....	48
5.1 Origine et structure de la FB <sub>1</sub> .....	48
5.2 Exposition de l'homme .....	49
5.3 Toxicocinétique.....	50
5.4 Effets toxiques .....	51
5.4.1 Effet sur les sphingolipides.....	51
5.4.2 Cancérogénicité .....	52
5.4.3 Génotoxicité et mutagénicité .....	52
5.4.4 Tératogénicité .....	52

5.5 Effets de la FB <sub>1</sub> sur les animaux .....	53
5.5.1 Cheval.....	53
5.5.2 Porc .....	53
5.5.3 Volailles.....	53
6. Les aflatoxines (AF).....	54
6.1 Origine et structure des Aflatoxines .....	54
6.2 Exposition de l'homme.....	54
6.3 Toxicocinétique.....	55
6.4 Effets toxiques .....	55
6.4.1 Cancérogénicité .....	56
6.4.2 Génotoxicité et mutagénicité. ....	56
6.4.3 Tératogénicité .....	56
6.5 Effets des aflatoxines sur les animaux .....	56
6.4.1 Bovins.....	56
6.4.2 Porcins .....	57
6.4.3 Volailles.....	57
6.4.4 Animaux de compagnie (chat et chien).....	58
7. Le désoxynivalénol (DON).....	58
7.1 Origine et structure du désoxynivalénol (DON) .....	58
7.2 Exposition de l'homme .....	59
7.3 Toxicocinétique du DON .....	60
7.4 Effets toxiques du DON .....	60
7.4.1 Cancérogénicité.....	60
7.4.2 Génotoxicité et mutagénicité.....	60
7.4.3 Tératogénicité .....	61
7.5 Effets du DON sur les animaux.....	61
7.5.1 Porcins .....	61
7.5.2 Volailles.....	61
7.5.3 Bovins.....	61
8. La multi-contamination par mycotoxines .....	62
8.1 Facteurs influençant la production des mycotoxines .....	62
8.1.1 OTA .....	62
8.1.2 CIT .....	63
8.1.3 AF.....	63
8.1.4 DON .....	63
8.1.5 ZEA .....	64
8.1.6 FB.....	64
8.2 La présence de plusieurs mycotoxines dans les aliments .....	64
8.3 Effets de la multi-contamination par les mycotoxines .....	65
8.3.1 Etudes in vivo .....	65
8.3.2 Etudes in vitro .....	66

## Partie 2: Devenir des toxiques et apparition de cancer

1. Métabolisation des xénobiotiques .....	69
1.1 Généralités .....	69
1.2 Les peroxydases.....	71
1.3 Les glutathion-S-transférases.....	71
2. Cancérogenèse et adduits à l'ADN .....	73
2.1 Notions générales de cancérogenèse .....	73
2.2 Les adduits à l'ADN comme marqueurs de la génotoxicité .....	76
2.3 Effets biologiques des adduits à l'ADN.....	76
2.3.1 Adduits stables et adduits dépurinants .....	76
2.3.2 Formation d'adduits et cancérogenèse .....	77
2.3.2.1 Relations entre adduits et mutations .....	77
2.3.2.2 Relation entre le développement tumoral et la formation d'adduits à l'ADN.....	78
2.3.3 Adduits comme marqueurs d'exposition .....	79

## Partie 3: Règlementation et impact économique

1. Législation concernant les mycotoxines .....	82
1.1 Étapes de la détermination de la dose journalière admissible (DJA) .....	82
1.1.1 La dose journalière admissible (DJT ou DJA) .....	82
1.1.2 La dose virtuellement sûre (DVS) .....	83
1.1.3 Le facteur de sécurité (FS) .....	83
1.2 Doses journalières admissibles des mycotoxines .....	84
1.2.1 Dose journalière admissible d'OTA .....	84
1.2.2 Dose journalière admissible de la ZEA .....	84
1.2.3 Dose journalière admissible d'AF .....	84
1.2.4 Dose journalière admissible des trichothécènes .....	84
1.2.5 Dose journalière admissible des FB .....	84
1.3 Règlementation des mycotoxines dans les denrées alimentaires .....	85
1.4 Règlementation dans les céréales destinées à l'alimentation animale .....	87
1.5 Evolution de la réglementation dans le monde .....	88
2. Impact économique des mycotoxines.....	89
2.1 Impact sur la production agricole.....	89
2.2 Impact sur les animaux.....	90

## Partie 4: Désactivation des mycotoxines

1. Agents adsorbants ou désactivants.....	93
1.1 L'adsorption .....	93
1.1.1 Le charbon actif.....	93
1.1.2 Les aluminosilicates.....	94
1.1.3 Les Zéolites .....	94
1.1.4 Choléstyramine .....	95
1.2 Méthodes biologiques de décontamination .....	95
1.2.1 Désactivation de l'OTA par transformation .....	95
1.2.2 Désactivation de ZEA par transformation .....	97
1.3 Composition de la paroi cellulaire des levures.....	99
1.3.1 Désactivation de la ZEA par les levures et leurs parois .....	100
1.3.2 Désactivation de l'OTA par les levures et leurs parois .....	101
1.3.2.1 Désactivation de l'OTA par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	101
1.3.2.3 Désactivation de l'OTA dans les vins par différentes levures .....	102
1.3.2.4 Désactivation de l'OTA par la levure <i>Phaffia rhodozyma</i> .....	103
1.3.3 Désactivation de ZEA, OTA par différentes souches de levures .....	103
1.3.4 Désactivation de l'AFB <sub>1</sub> par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	104
1.3.5 Adsorption de l'OTA et l'AFB <sub>1</sub> par les parois de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	105
1.3.6 Adsorption des mycotoxines par les glucomannanes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	105
1.3.7 Capacité de liaison des mycotoxines par <i>S. cerevisiae</i> ou des bactéries lactiques dans le tractus gastro-intestinal .....	106
1.4 Les études comparatives des différents adsorbants du commerce.....	107
1.4.1 Comparaison d'adsorption de ZEA par plusieurs adsorbants commerciaux .....	107
1.4.2 Désactivation des mycotoxines par le produit Biomin® MTV .....	109
1.4.3 Désactivation des mycotoxines par les produits Myco-AD® et Myco AD- AZ® .....	110
2. La désactivation par les antioxydants.....	111
2.1 Mycotoxines et stress oxydatif -Impact sur les défenses anti-oxydantes .....	111
2.1.1 OTA .....	111
2.1.2 AFB <sub>1</sub> .....	113
2.1.3 ZEA .....	114
2.2 Le glutathion (GSH).....	115
2.2.1 Les mycotoxines et le GSH .....	115
2.2.1.1 OTA .....	116
2.2.1.2 AFB <sub>1</sub> .....	117
2.2.1.3 ZEA.....	117
2.3 Le sélénium (Se) .....	117

2.3.1 Le sélénium et la production des espèces oxygénées activées (ROS)	118
2.3.2 Le sélénium et l'AFB <sub>1</sub>	119
2.3.3 Le sélénium et le DON	119
2.3.4 Le sélénium dans la prévention du cancer	120
2.3.5 Les produits commerciaux du sélénium et réglementation	120
2.3.6 Les levures enrichies en sélénium	120
<b>3. Conclusion bibliographique</b>	<b>121</b>

## Matériels et Méthodes

<b>1. Extraction des mycotoxines et/ou leurs dérivés</b>	<b>123</b>
1.1 Principe général des extractions des mycotoxines	123
1.2 Extraction de l'OTA à partir de différentes matrices alimentaires	124
1.2.1 Extraction de l'ochratoxine A par la méthode utilisée au sein de notre laboratoire (en milieu acide)	124
1.2.2 Extraction de l'OTA par la méthode officielle	126
1.3 Méthode d'extraction de l'OTA et dérivés, CIT et AF à partir d'organes	126
1.4 Méthode d'extraction de l'OTA, et ses dérivés, CIT et AF à partir du sang	126
1.5 Méthode d'extraction de l'OTA et ses dérivés, CIT et AF à partir des surnageants cellulaires	127
1.6 Confirmation de la présence d'OTA par hydrolyse par la carboxypeptidase	127
1.7 Méthode d'extraction des fumonisines à partir de différentes matrices alimentaires (croquettes de chats et de chiens, riz, blé, orge,...)	127
1.8 Méthode d'extraction des fumonisines à partir d'organes	129
1.9 Méthode d'extraction de la zéaralénone à partir de différentes matrices alimentaires (croquettes de chats et de chiens, riz, blé, orge,...)	129
1.10 Méthode d'extraction de la zéaralénone à partir d'organes	130
1.11 Méthode d'extraction du DON à partir des céréales	130
1.12 Préparation des solutions standards de toxines	130
1.13 Préparation de dérivés standard de l'OTA	131
1.13.1 Préparation des formes OT $\alpha$ , OT $\beta$ et OT $\gamma$	131
1.13.2 Préparation des formes ouvertes des ochratoxines	131
1.13.3 Préparation de l'OTC et des formes méthylées et éthylées.	131
1.13.4 Préparation des dérivés conjugués au glutathion ou à la N-acétyl cystéine (NAC)	131
<b>2. Séparation et détection des mycotoxines et leurs métabolites</b>	<b>132</b>
2.1 Produits et matériels	132
2.2 Appareillage	132
2.3 Analyses par Chromatographie en phase Liquide de Haute Performance (HPLC)	133
2.3.1 Principe de l'HPLC	133
2.3.2 Description du système HPLC	133
2.3.3 Analyse HPLC pour la détection de l'OTA, ses dérivés et la CIT	134
2.3.3.1 Paramètres d'analyse HPLC	134
2.3.3.2 Analyses HPLC réalisées en conditions isocratiques	134
2.3.3.3 Analyses HPLC réalisées en conditions de gradients	134
2.3.4 Analyses HPLC pour la détection des aflatoxines	136
2.3.5 Analyses HPLC pour la détection des fumonisines	137
2.3.6. Analyses HPLC réalisées pour la détection de la zéaralénone.	137
2.4 La détection du DON	137
2.4.1 Analyse du DON par spectroscopie de masse (MS)	137
2.4.1.1 Principe	137
2.4.1.2 Description du système.	138
2.4.2 Analyse du DON en utilisant le test ELISA	139
2.4.2.1 Principe	139
2.4.2.2 Dosage du DON par le kit ELISA	139
2.5 Rendement de récupération et limites de détection et de quantification	140
<b>3. Utilisation de lignées cellulaires</b>	<b>141</b>
3.1. Généralités.	141
3.2 Avantages et inconvénients de leur utilisation.	141
3.3 Description des lignées utilisées.	142
3.3.1 Les cellules rénales d'opossum (OK) (ATCC CRL-1840).	142

3.3.2 Les cellules rénales humaines (HK2) (CRL-2190).....	142
3.3.3 Les cellules mammaires humaines (MCF7) (ATCC HTB-22).....	142
3.4 Produits utilisés en culture cellulaire.....	142
3.5 Conditions de culture.....	143
3.5.1 Maintien des constantes physico-chimiques.....	143
3.5.2 Mise en culture d'une lignée cellulaire.....	143
3.5.3 Amplification d'une lignée cellulaire.....	143
3.5.4 Mise en conservation d'une culture cellulaire.....	144
3.6 Conditions de traitement des cellules pour la détection des adduits.....	144
4. Test de viabilité cellulaire.....	145
4.1 Produits utilisés pour le test de viabilité cellulaire.....	145
4.2 Principe du test de viabilité cellulaire.....	145
5. Test de génotoxicité.....	146
5.1 Extraction de l'ADN selon matrice.....	146
5.1.1 A partir de tissus.....	146
5.1.2 A partir du sang.....	147
5.1.3 A partir des cellules.....	147
5.2 Purification et dosage de l'ADN.....	147
5.3 Estimation de la qualité et de la quantité d'ADN.....	148
5.4 Analyse des adduits à l'ADN par la méthode du post-marquage au phosphore 32.....	148
5.4.1 Produits utilisés pour le post-marquage.....	148
5.4.1.1 Les produits chimiques.....	148
5.4.1.2 Les enzymes.....	148
5.4.1.3 Matériels de chromatographie.....	149
5.4.1.4 Les adduits standard.....	149
5.4.2 Principe du post-marquage.....	149
5.4.3 Marquage des adduits.....	151
5.4.3.1 Hydrolyse de l'ADN.....	151
5.4.3.2 Enrichissement à la nucléase P1.....	151
5.4.3.3 Marquage des adduits au 32P en position 5'.....	151
5.4.3.4 Test d'efficacité de l'hydrolyse : marquage des nucléotides normaux.....	151
5.4.3.5 Test d'efficacité de l'enrichissement par la nucléase P1.....	152
5.4.3.6 Séparation des adduits par chromatographies bidimensionnelles sur couche mince de polyéthylène-imine-cellulose.....	152
A) Dépôt des échantillons et purification des adduits (Dimension 1).....	152
B) Transfert et migration bidimensionnelle pour la séparation des adduits.....	153
5.4.4 Autoradiographie et quantification des adduits.....	154

## Résultats et discussions

### Chapitre I: Evaluation de la multi-contamination en mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale

1. Alimentation humaine : blé, orge, riz, café, jambon, lait.....	157
1.1 Les céréales.....	157
1.1.1 Blé et orge.....	157
1.1.2 Le riz.....	163
1.2 Le café.....	164
1.2.1 Préparation du café à partir des dosettes.....	164
1.2.2 Préparation du café moulu.....	165
1.2.2.1 Préparation du café avec la cafetière électrique à filtre.....	165
1.2.2.2 Préparation du café avec la cafetière à pression.....	165
1.2.3 Quantité des aflatoxines et de l'ochratoxine A.....	165
1.2.3.1 Dosage des aflatoxines.....	165
1.2.3.2 Dosage de l'ochratoxine A.....	165
1.3 Le jambon.....	168
1.4 Le lait de vaches et leurs rations.....	170
1.4.1 Suivi du transfert des mycotoxines dans le lait lors d'une exposition d'une semaine.....	170
1.4.1.1 Dans les rations.....	170
1.4.1.2 Dans le lait.....	171

1.4.2 Suivi du transfert dans le lait suite à l'exposition à long terme (temps d'utilisation du silo) .....	173
1.4.2.1 Dans les rations .....	173
1.4.2.2 Dans le lait .....	173
<b>2. Alimentation animale : cas des croquettes pour chat et chien .....</b>	<b>176</b>
<b>2.1 Croquettes de chat .....</b>	<b>176</b>
<b>2.1.1 Provenant de plusieurs élevages de chats .....</b>	<b>176</b>
2.1.1.1 Comparaison aux recommandations animales .....	180
2.1.1.2 Comparaison à la législation humaine .....	180
2.1.1.3 Corrélation ingrédients/mycotoxines .....	181
<b>2.1.2 Provenant d'un industriel .....</b>	<b>181</b>
2.1.2.1 Comparaison aux recommandations animales .....	184
2.1.2.2 Comparaison à la législation humaine .....	184
<b>2.2 Croquettes de chien .....</b>	<b>185</b>
<b>2.2.1 Provenant de plusieurs élevages de chiens .....</b>	<b>185</b>
2.2.1.1 Comparaison aux recommandations animales .....	187
2.2.1.2 Comparaison à la législation humaine .....	187
2.2.1.3 Corrélations ingrédients/mycotoxines .....	188
<b>2.2.2 Provenant du commerce .....</b>	<b>188</b>
2.2.2.1 Comparaison aux recommandations animales .....	191
2.2.2.2 Comparaison à la législation humaine .....	191
2.2.2.3 Classification des 30 échantillons .....	192
2.2.2.4 Conclusion sur la classification des croquettes pour l'INC .....	193
2.2.2.5 Corrélation ingrédients /mycotoxines .....	193
<b>2.3 Discussions sur les croquettes de chat et de chien .....</b>	<b>193</b>
2.3.1 OTA .....	194
2.3.2 CIT .....	194
2.3.3 AFB <sub>1</sub> .....	194
2.3.4 ZEA .....	195
2.3.5 FB .....	195
2.3.6 DON .....	196
<b>3. Simulation de l'apport en plusieurs mycotoxines simultanément .....</b>	<b>196</b>
<b>3.1 Alimentation humaine .....</b>	<b>196</b>
<b>3.1.1 L'apport en OTA .....</b>	<b>196</b>
3.1.1.1 Dans les céréales brutes : blé, orge, riz .....	196
3.1.1.2 Dans le jambon .....	197
3.1.1.3 Dans le lait .....	197
3.1.1.4 Dans le café .....	197
<b>3.1.2 L'apport en AFB<sub>1</sub> .....</b>	<b>197</b>
3.1.2.1 Dans le jambon .....	197
<b>3.1.3 L'apport en FB .....</b>	<b>198</b>
3.1.3.1 Dans le riz .....	198
<b>3.1.4 L'apport en ZEA .....</b>	<b>198</b>
3.1.4.1 Dans le lait .....	198
<b>3.2 Alimentation animale .....</b>	<b>200</b>
3.2.1 Pour les chats .....	200
3.2.2 Pour les chiens .....	200
<b>4. Conclusion du chapitre .....</b>	<b>201</b>

## Chapitre II : Les effets toxiques de la multi-contamination par les mycotoxines

<b>1. Effet sur les cellules .....</b>	<b>203</b>
<b>1.1 Evaluation de l'effet cytotoxique de l'OTA, de la CIT et de la FB .....</b>	<b>203</b>
<b>1.1.1 Comparaison de l'exposition des cellules rénales humaines (HK2) et d'opossum (OK) à l'OTA, la CIT, la FB<sub>1</sub> .....</b>	<b>203</b>
1.1.1.1 Effet de l'OTA .....	203
1.1.1.2 Effet de la CIT .....	203
1.1.1.3 Effet de la FB <sub>1</sub> .....	203
<b>1.1.2 Viabilité des cellules rénales humaines (HK2) exposées aux mycotoxines(OTA, CIT, FB) .....</b>	<b>204</b>



1.1.2.1 Effet de l'OTA, de la CIT, de la FB <sub>1</sub> sur les HK2 .....	204
1.1.2.2 Effet de la coexposition des cellules HK2 à l'OTA et la CIT ou l'OTA plus CIT et FB <sub>1</sub> .....	205
1.1.2.3 Effet de la co-exposition des cellules HK2 à l'OTA et la FB <sub>1</sub> ou l'OTA et la CIT et la FB <sub>1</sub> ....	205
1.1.2.4 Effet de la co-exposition des cellules HK2 à la FB <sub>1</sub> et la CIT ou à l'OTA et la CIT et la FB <sub>1</sub> 206	
1.1.2.5 Effet de l'exposition des HK2 à l'OTA ou à la ZEA seule ou aux deux toxines simultanément	207
<b>1.1.3 Viabilité des cellules humaines mammaires (MCF7) exposées à l'OTA et/ou la ZEA .....</b>	<b>208</b>
1.1.3.1 Effet de l'OTA et ZEA seule et OTA+ZEA sur la viabilité des cellules MCF7 .....	208
1.1.3.2 Comparaison de l'effet de l'OTA, et la ZEA sur la viabilité des cellules rénales humaines (HK2) et des cellules mammaires humaines (MCF7) .....	209
<b>1.2 Impact des mycotoxines sur la génotoxicité .....</b>	<b>211</b>
1.2.1 Effets génotoxiques de l'OTA, CIT et FB <sub>1</sub> sur les cellules HK2 .....	211
1.2.2 Effets génotoxiques de l'OTA et ZEA sur les cellules HK2 .....	213
1.2.2.1 Traitement avec la ZEA seule .....	213
1.2.2.2 Coexposition des cellules HK2 à l'OTA et à la ZEA .....	214
<b>2. Etude des mécanismes d'action impliqués dans la toxicité et génotoxicité des mycotoxines .....</b>	<b>215</b>
<b>2.1 Relation-structure -activité de l'OTA .....</b>	<b>215</b>
<b>2.2 Impact des mycotoxines OTA et/ou FB<sub>1</sub> sur la cascade de l'acide arachidonique et des Mapk .....</b>	<b>216</b>
<b>3. Effet sur les animaux .....</b>	<b>218</b>
<b>3.1 OTA/FB<sub>1</sub> sur le rat .....</b>	<b>218</b>
<b>3.2 OTA/FB<sub>1</sub> sur le porc .....</b>	<b>220</b>
<b>4. Etude de terrain .....</b>	<b>222</b>
<b>4.1 Mycotoxines et la baisse de fertilité chez le chat .....</b>	<b>222</b>
4.1.1 Résultats du 1 <sup>er</sup> élevage .....	224
4.1.1.1 Etape 1 .....	224
4.1.1.1.1 Analyse des mycotoxines dans les croquettes .....	224
4.1.1.1.2 Analyse des mycotoxines dans les organes du chaton .....	225
4.1.1.2 Etape2 .....	226
4.1.1.2.1 Analyse des mycotoxines dans les croquettes .....	226
4.1.1.2.2 Analyse des mycotoxines dans le sang .....	227
4.1.1.3 Etape 3 .....	228
4.1.1.3.1 Analyse des mycotoxines dans les croquettes .....	228
4.1.1.3.2 Analyse des mycotoxines dans le sang et les organes .....	229
<b>4.1.2 Résultats du 2<sup>ème</sup> élevage .....</b>	<b>229</b>
4.1.2.1 Analyse des mycotoxines dans les croquettes .....	229
4.1.2.2 Analyse des mycotoxines dans les organes .....	229
<b>4.1.3 Analyse des adduits à l'ADN dans les organes des chatons mort-né. ....</b>	<b>232</b>
<b>4.2 Mycotoxines dans l'alimentation des chevaux .....</b>	<b>233</b>
4.2.1 Mycotoxines dans la luzerne .....	233
4.2.2 Mycotoxines dans le foin .....	234
4.2.3 Mycotoxines dans le maïs .....	235
4.2.3.1 Préparation des échantillons pour l'analyse des fumonisines .....	235
4.2.3.2 Préparation des échantillons pour l'analyse de l'OTA et la CIT .....	237
<b>5. Conclusion du chapitre .....</b>	<b>237</b>

### Chapitre III : Désactivation de l'ochratoxine A (OTA) et la zéaralénone (ZEA) par les parois de levures et les levures enrichies en glutathion ou en sélénométhionine

<b>1. Désactivation de l'OTA et de la ZEA par les levures enrichies en antioxydant (glutathion et sélénométhionine) dans les cellules rénales (HK2) et les cellules des glandes mammaires (MCF7) .....</b>	<b>240</b>
--	------------

<b>1.1 Evaluation de la viabilité cellulaire suite à l'exposition des cellules (HK2 et MCF7) au glutathion pur ou à la sélénométhionine pur .....</b>	<b>240</b>
1.1.1 Effet du glutathion et sélénométhionine sur la viabilité des cellules rénales humaines (HK2) ....	240
1.1.2 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence de glutathion sur la viabilité cellulaires des HK2 ....	241
1.1.3 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence de sélénométhionine sur la viabilité cellulaire des HK2 .....	242

1.1.4 Effet du glutathion et sélénométhionine sur la viabilité des cellules des glandes mammaires (MCF7) .....	243
1.1.5 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence du glutathion sur la viabilité cellulaire des MCF7 ...	243
1.1.6 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence de sélénométhionine sur la viabilité cellulaire des MCF7 .....	244
<b>1.2 Evaluation de la viabilité cellulaires des HK2 et MCF7 exposées à l'OTA, la ZEA en présence de levures enrichies en glutathion ou en sélénométhionine .....</b>	<b>245</b>
1.2.1 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence de levures enrichies en glutathion(LGSH) sur la viabilité des cellules rénales humaines (HK2) .....	245
1.2.2 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence des levures enrichies en sélénométhionine (LS) sur la viabilité des cellules rénales humaines HK2 .....	246
1.2.3 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence de levures enrichies en glutathion (LGSH) sur la viabilité des cellules mammaires humaines (MCF7) .....	247
1.2.4 Effet des toxines (OTA, ZEA) avec les levures enrichies en sélénométhionine (LS) sur les cellules mammaires humaines (MCF7) .....	248
1.2.5 Conclusion sur la cytotoxicité .....	249
<b>1.3 Evaluation de la génotoxicité (formation d'adduits à l'ADN) sur les cellules (HK2 et MCF7) .....</b>	<b>249</b>
1.3.1 Effet sur les cellules rénales ( HK2) .....	249
1.3.1.1 Effet GSH/ SE/levures GSH/Levure sélénée sur la génotoxicité de l'OTA .....	249
1.3.1.2 Effet GSH/ SE/levures GSH/Levure sélénée sur la génotoxicité de la ZEA .....	250
1.3.1.3 Effet GSH/ SE/levures GSH/Levure sélénée sur la génotoxicité combinée de la ZEA et de l'OTA .....	251
1.3.2 Sur les cellules MCF7 .....	251
1.3.2.1 Effet GSH/ SE/levures GSH/Levure sélénée sur la génotoxicité de l'OTA .....	251
1.3.2.2 Effet GSH/ SE/levures GSH/Levure sélénée sur la génotoxicité de la ZEA .....	252
1.3.2.3 Effet GSH/ SE/levures GSH/Levure sélénée sur la génotoxicité combinée de la ZEA et de l'OTA .....	252
1.3.3 Conclusion sur la génotoxicité .....	253
<b>1.4 Analyse des métabolites d'OTA formés dans les cellules rénales (HK2) et de glandes mammaires (MCF7) traitées avec GSH/SE/Levures GSH /levures sélénées .....</b>	<b>253</b>
1.4.1 Au niveau des cellules rénales humaines HK2 .....	253
1.4.1.1 Exposition à l'OTA .....	253
1.4.1.2 Exposition à la ZEA .....	255
1.4.1.3 Exposition simultanée à l'OTA+ZEA .....	257
1.4.2 Au niveau des cellules de glandes mammaires humaines (MCF7) .....	259
1.4.2.1 Exposition à l'OTA .....	259
1.4.2.2 Exposition à la ZEA .....	261
1.4.2.3 Exposition à l'OTA+ZEA .....	262
<b>1.5 Corrélation entre métabolisation et génotoxicité .....</b>	<b>263</b>
<b>2. Désactivation de l'OTA par les parois de levures et les levures enrichies en antioxydant .....</b>	<b>264</b>
2.1 Etude de détoxification de l'OTA chez le poulet de chair par les parois de levures et les levures enrichies en antioxydant (glutathion et sélénométhionine) .....	265
2.2 Concentration d'OTA dans le sang, bile et tissus des poulets .....	266
2.2.1 Concentration d'OTA dans le sang et la bile des poulets (analyses faites par J Fink-Gremmels) .....	266
2.2.2 Concentration d'OTA dans les tissus des poulets .....	266
2.3 Evaluation de la génotoxicité (formation d'adduits à l'ADN) .....	270
2.3.1 Comparaison du profil d'adduits rénaux et hépatiques des animaux contrôles et des animaux contaminés en OTA seule .....	270
2.3.2 Comparaison du profil d'adduits rénaux et hépatiques des animaux du groupe 12 (levure vivante) et du groupe 13 (charbon actif) .....	271
2.3.3 Comparaison du profil d'adduits rénaux et hépatiques du groupe 10 (paroi de levure boulangère) et 11 (paroi de levure brassicole) .....	272
2.3.4 Comparaison du profil d'adduits rénaux et hépatiques des animaux du groupe 3 (levure glutathion) et du groupe 6 (levure sélénée) .....	273
2.4 Analyse des métabolites d'OTA formés au niveau du rein et du foie/comparaison aux adduits .....	274
2.4.1 Profil des métabolites dans les reins et foies des animaux du groupe 2 (témoin positif) .....	274
2.4.2 Profil des métabolites dans les foies des animaux nourris avec OTA en présence de levure vivante (groupe 12) ou de charbon actif (groupe 13) .....	275
2.4.3 Profil des métabolites dans les foies des animaux nourris avec OTA en présence de parois de levure boulangère (groupe 10) ou de parois de levure brassicole (groupe 11) .....	276

2.4.4 Profil des métabolites dans les foies des animaux nourris avec OTA en présence de levures enrichies au GSH (groupe 3) ou enrichies en sélénométhionine (groupe 6) .....	277
2.4.5 Profil des métabolites dans les reins des animaux nourris avec OTA en présence de levure vivante (groupe 12) ou de charbon actif (groupe 13) .....	278
2.4.6 Profil des métabolites dans les reins des animaux nourris avec OTA en présence de parois de levure boulangère (groupe 10) ou de parois de levure brassicole (groupe 11) .....	279
2.4.7 Profil des métabolites dans les reins des animaux nourris avec OTA en présence de levures enrichies au GSH (groupe 3) ou enrichies en sélénométhionine (groupe 6) .....	280
2.4.8 Conclusion concernant la métabolisation et la génotoxicité de l'OTA chez les poulets nourris avec de l'OTA et des dérivés de levures .....	281
<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>284</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>288</b>

# Liste des figures

## Partie bibliographique 1

Figure 1: Structure des ochratoxines A, B et C .....	31
Figure 2: Métabolisation de l'OTA (adapté de Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2006 ; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2012) .....	34
Figure 3 : Voies connues de métabolisation de l'OTA conduisant aux adduits sur la guanine (d'après Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2012) .....	34
Figure 4 : Cycle d'oxydoréduction des formes quinones de l'OTA .....	35
Figure 5: Métabolisation de la zéaralénone .....	41
Figure 6 : Zéaralénone et œstrone .....	42
Figure 7 : Prolapsus vaginale chez la truie et le nouveau-né (photos gracieusement données par BIOMIN®) ..	45
Figure 8 : Malformation des membres du porc suite à une ingestion de ZEA par la mère (photo gracieusement donnée par BIOMIN®) .....	45
Figure 9 : Structure de la citrinine et des composés de dégradation formés à partir de la CIT .....	47
Figure 10 : Structure de la FB1 .....	49
Figure 11 : Structure de la sphinganine et de la sphingosine ..	49
Figure 12 : Effets de la FB <sub>1</sub> sur le métabolisme des sphingolipides (D'après Merrill et al., 2001) .....	51
Figure 13 : Structure chimique des aflatoxines .....	54
Figure 14 : Schéma de la métabolisation des aflatoxines (adaptés de Meissonnier et al., 2005) .....	55
Figure 15 : Structure chimique des tricothécènes .....	59
Figure 16 : Structure chimique du DON .....	59
Figure 17 : Diversité des mycotoxines (site internet de l'INRA) .....	62
Figure 18 : Principales voies de distribution, d'absorption et d'excrétion des molécules toxiques (d'après Pussa, 2007) .....	69

## Partie bibliographique 2

Figure 19 : Conjugaison au glutathion et biosynthèse d'acide mercapturique. ....	73
Figure 20 : Vue générale des différents modes d'action des cancérigènes chimiques (d'après Luch, 2005 ; Faucet-Marquis, 2005). ....	75
Figure 21 : Les principales étapes de la cancérogenèse chimique. ....	75
Figure 22 : Sites potentiels de la formation d'adduits à l'ADN.....	76
Figure 23 : Processus tumoral et les adduits (Pfohl-Leszkowicz, 2008) .....	78
Figure 24 : Différentes possibilités de relations entre le taux d'adduits à l'ADN et l'incidence de tumeurs en fonction d'une dose chronique de cancérigène .....	79

## Partie bibliographique 3

Figure 25 : Différents organismes impliqués dans la législation de résidus (adaptés des cours de toxicologie du Pr Pfohl-Leszkowicz) .....	82
Figure 26 : Détermination de la DJA .....	83
Figure 27 : Etapes de détermination du seuil autorisé de contamination en mycotoxine .....	83
Figure 28 : Pourcentage de la population mondiale protégée par des réglementations sur les mycotoxines (Rapport FAO, 2003) .....	88

## Partie bibliographique 4

Figure 29 : Dégradation de l'OTA en phénylalanine et OTα (D'après Varga et al., 2010) .....	95
Figure 30 : Structures chimiques de différents métabolites de la ZEA (Adapté de Jard, 2009). ....	97
Figure 31 : Organisation moléculaire générale de la paroi cellulaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Smits et al., 2001). EP : espace périplasmique, CWP : «cell wall proteins», mannoprotéines de la paroi cellulaire, Pir : «Proteins with internal repeats», mannoprotéines qui possèdent des séquences internes répétées, GPI : groupement glycosylphosphatidylinositol. ....	99
Figure 32 : Fixation de la Zéaralénone (en violet) dans l'hélice des glucanes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (D'après Yiannikouris et al., 2004a).....	100
Figure 33 : Pourcentage des valeurs d'OTA dégradé par les levures à la fin de la fermentation dans le vin blanc et rouge (Cecchini et al., 2006).....	102

Figure 34 : Taux de mycotoxines (mg/kg) avant et après 10 jours culture de levures <i>Rhodotorula rubra</i> dans les graines de tournesol (à gauche) et <i>Rhodotorula glutinis</i> dans le maïs (à droite) (Bakutisi et al., 2005). ....	103
Figure 35 : Taux de mycotoxines (mg/kg) avant et après 10 jours culture de levures <i>Geotrichum fermentans</i> (à gauche) et de <i>Kluyveromyces marxianus</i> (à droite) dans les composés de fourrage (Bakutisi et al., 2005). ....	104
Figure 36 : Effet du temps d'incubation (A) et le pH(B) sur pourcentage de ZEA supprimée dans le solvant par le Mycofix®. (Chaque point correspond à une moyenne de 2 essais) (D'après Döll et al., 2004) .....	108
Figure 37 : moyenne du pourcentage de ZEA adsorbée par plusieurs agents détoxifiants sous conditions de pH de l'estomac (blanc) (n=2) et tout le long de l'expérience (gris) (n=4) (d'après Döll et al., 2004). ....	108
Figure 38 : pourcentage de ZEA adsorbée par cholestyramine (●), aluminosilicate modifié(+), Toxisorb® (□), Mycosorb® Extra (Δ), et bentonite (○) par l'augmentation du ratio (adsorbant/ZEA)(d'après Döll et al., 2004) .....	109
Figure 39 : Effet sur la taille de la vulve et les organes de reproduction des truies nourries avec 6 ppm de DON et 1,2 ppm de ZEA pendant 21 jours (d'après Tamames, 2009). ....	111
Figure 40 : Balance entre antioxydants et pro-oxydants .....	114
Figure 41 : Formule chimique du glutathion (à gauche), forme réduite et oxydée (à droite) (adapté de Chabaud, 2007) .....	115
Figure 42 : Formation de composés sélénés dans l'organisme (Siliart, 2007).....	117
Figure 43 : Biosynthèse du sélénométhionine dans les plantes, algues et les levures (à gauche) ; métabolisme du sélénométhionine, sélénite et sélénate (à droite) (d'après Schrauzer, 2000). ....	118
Figure 44 : Effets bénéfiques du sélénium .....	119

## Matériels et Méthodes

Figure 45 : Schéma de l'extraction des mycotoxines à partir de matériel biologique.....	124
Figure 46 : Les étapes d'extraction et de purification de l'OTA et ses métabolites, CIT et AF par la méthode utilisée au sein de notre laboratoire (en milieu acide).....	125
Figure 47 : Extraction de l'OTA par la méthode des colonnes d'immuno-affinité (IAC) .....	126
Figure 48 : Etapes d'extraction des fumonisines .....	128
Figure 49 : Schéma des différentes étapes de la technique d'immuno-affinité. (particules jaunes : les anticorps greffés ; particules rouges : molécule de ZEA provenant de l'échantillon ; particules bleus : tampon (eau))...	128
Figure 50 : Etapes d'extraction de la zéaralénone .....	129
Figure 51 : Schéma d'une chaîne HPLC. ....	133
Figure 52 : Schématisation de gradient utilisé en HPLC, gradient «1 » (Faucet-Marquis, 2005).....	135
Figure 53 : Profil HPLC de l'OTA et ses métabolites .....	135
Figure 54 : Schématisation du gradient utilisé en HPLC, gradient «2 » .....	136
Figure 55 : profil HPLC de la ZEA et ses métabolites.....	136
Figure 56 : Schéma des connexions du Kobra Cell® (Cellule électrochimique pour la dérivation des aflatoxines par HPLC). ....	137
Figure 57 : Processus d'électrospray (ESI)- Schéma de principe (d'après Gaskell, 1997). ....	138
Figure 58 : Principe du test ELISA .....	139
Figure 59 : Schéma de la culture des cellules.....	144
Figure 60 : Structure du MTS tétrazolium et son produit le formazan .....	145
Figure 61 : Test de cytotoxicité cellulaire.....	146
Figure 62 : Spectre d'ADN non pur contaminé en protéines (photo de gauche) et ADN pur (photo de droite). ....	148
Figure 63 : Principe de la méthode du post-marquage au 32P .....	150
Figure 64 : Schéma de migration des nucléotides normaux : a) autoradiographie après marquage des nucléotides normaux, b) autoradiographie après "enrichissement" à la nucléase P1.....	152
Figure 65 : Chromatographies successives pour la purification et la séparation des adduits sur des plaques de PEI-cellulose.....	154

## Résultats et discussions

### Chapitre I

Figure 66 : Exemple de diagramme en boîte à moustache .....	156
Figure 67 : Etapes d'extraction de l'OTA par la méthode en milieu acide (à gauche) et par la méthode des colonnes d'immuno-affinité (IAC) (à droite).....	158
Figure 68 : Formes d'OTA selon le pH .....	159
Figure 69 : Répartition des taux d'OTA et CIT dans les céréales tchèques .....	159

Figure 70 : Répartition des taux en OTA et CIT dans les céréales tchèques (graphe excluant les deux plus fortes valeurs) .....	160
Figure 71 : Répartition des taux d'OTA et CIT dans le blé et l'orge .....	160
Figure 72 : Les systèmes de préparation du café : A-électrique ; B-espresso ; C-nespresso ; D- senseo .....	164
Figure 73 : Appréciation de la contamination en OTA dans le café .....	165
Figure 74 : Photos de champignons prélevés sur le jambon .....	168
Figure 75 : Photo des différents endroits de prélèvement pour la recherche des mycotoxines .....	168
Figure 76 : Répartition des taux d'OTA et de CIT dans le jambon .....	169
Figure 77 : Comparaison des chromatogrammes des échantillons contaminés en OTA. Lait1 (noir), lait2 (rouge), lait 5 (bleu), standards de métabolites d'OTA (rose) .....	172
Figure 78 : Comparaison des chromatogrammes des échantillons non contaminés en OTA. Lait 3 (noir), lait 4 (rouge), lait 6 (bleu), standards de métabolites d'OTA (rose) .....	172
Figure 79 : Appréciation globale des co-contaminations dans les aliments de chat provenant d'élevage .....	178
Figure 80 : Répartition des taux d'OTA, de CIT et d'AFB <sub>1</sub> dans les croquettes de chat provenant d'éleveur ...	179
Figure 81 : Répartition des taux de ZEA, DON et FB dans les croquettes de chat provenant d'éleveur .....	180
Figure 82 : Appréciation globale des co-contaminations dans les aliments de chat provenant d'industriel .....	182
Figure 83 : Composition des croquettes (A : bâtonnet marron ; B : rond marron ; C : rond jaune) .....	182
Figure 84 : Répartition des taux d'OTA, de CIT et de AFB <sub>1</sub> dans les croquettes de chat provenant d'industriel. ....	183
Figure 85 : Répartition des taux de ZEA, de DON et de FB dans les croquettes de chat provenant d'industriel .....	184
Figure 86 : Appréciation globale des co-contaminations dans les aliments de chien provenant d'élevage .....	186
Figure 87 : Répartition des taux d'OTA, CIT et AFB <sub>1</sub> dans les croquettes de chien provenant d'éleveur .....	186
Figure 88 : Répartition des taux de ZEA, FB et DON dans les croquettes de chien provenant d'éleveur .....	187
Figure 89 : Appréciation globale des co-contaminations dans les aliments de chien provenant du commerce .	190
Figure 90 : Répartition des taux d'OTA, CIT et AFB <sub>1</sub> dans les croquettes de chien provenant du commerce ..	190
Figure 91 : Répartition des taux de ZEA, FB et DON dans les croquettes de chien provenant du commerce ...	191

## Résultats et discussions

### Chapitre II

Figure 92 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) et d'opossum (OK) en fonction des doses d'OTA, de CIT et de FB <sub>1</sub> seules après 24h et 48h d'exposition. ....	204
Figure 93 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des doses d'OTA, de CIT et de FB <sub>1</sub> seules après 24h et 48h d'exposition. ....	204
Figure 94 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des doses d'OTA et de CIT seules et combinées après 24h d'exposition. ....	205
Figure 95 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des doses d'OTA, de FB <sub>1</sub> seules et combinées après 24h et 48h d'exposition. ....	206
Figure 96 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des doses de CIT, de FB <sub>1</sub> seules et combinées après 24h et 48h d'exposition. ....	206
Figure 97 : Comparaison de l'effet des fortes doses d'OTA, ZEA seule et OTA+ZEA sur la survie des cellules rénales humaines HK2. ....	207
Figure 98 : Comparaison de l'effet des petites doses d'OTA, de ZEA seules ou combinées sur la survie des cellules rénales humaines HK2. ....	208
Figure 99 : Comparaison de l'effet des fortes doses d'OTA, ZEA seule et OTA+ZEA sur la survie des cellules mammaires humaines MCF7. ....	208
Figure 100 : Comparaison de l'effet des petites doses d'OTA, ZEA seule et OTA+ZEA sur la survie des cellules mammaires humaines MCF7. ....	209
Figure 101 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) et les cellules mammaires humaines (MCF7) en fonction des doses OTA et ZEA après 24h et 48h d'exposition. ....	210
Figure 102 : Formation d'adduit à l'ADN sur les cellules rénales humaines (HK2) par l'OTA seule, la CIT seule et la FB <sub>1</sub> seule. ....	211
Figure 103 : Formation de l'OTHQ à partir de l'OTA (à gauche), structure chimique de l'adduit C-C8 dG-OTA (C8) (à droite). ....	212
Figure 104 : Formation d'adduit à l'ADN sur les cellules rénales humaines (HK2) suite à l'exposition simultanée de plusieurs toxines après 2h de traitement. ....	212
Figure 105 : Formation des adduits à l'ADN des cellules rénales humaines par la ZEA: a- traitement 24 heures 0,5 µM ZEA. ....	213
Figure 106 : Formation d'adduit à l'ADN des cellules rénales humaines coexposées à l'OTA et la ZEA .....	214



Figure 107 : Formation d'adduit à l'ADN des cellules rénales humaines coexposées à l'OTA et la ZEA.....	214
Figure 108 : Structure chimique de l'OTA et de certains de ses dérivés. ....	216
Figure 109 : Effet génotoxique d'une co- contamination en OTA et FB <sub>1</sub> sur des reins de rat .....	218
Figure 110 : Formation de 8hydroxy 2-désoxyguanosine par des radicaux oxygénés .....	219
Figure 111 : Autoradiogrammes des adduits dans les reins de porcs. ....	220
Figure 112 : Photos des chatons malformés .....	222
Figure 113 : Origine des échantillons analysés.....	224
Figure 114 : Profil HPLC de séparation des aflatoxines dans les organes du chaton 1. (Rein en noir, foie en rouge et standard d'AF en bleu). ....	225
Figure 115 : Profil HPLC de séparation des fumonisines dans les organes du chaton 1. (Rein en noir, foie en rouge et standard de fumonisines en bleu).....	226
Figure 116 : Profil HPLC de séparation d'OTA dans les organes du chaton 1. (Rein en noir, foie en rouge) ..	226
Figure 117 : Profil HPLC de séparation de l'OTA et ses métabolites dans le sang du chat 1(en rose), le chat x (en bleu), le foie 1 en (rouge) et rein 1 (en noir).....	227
Figure 118 : Profil HPLC de séparation des aflatoxines dans le sang du chat 1(en noir) et le chat x (en rouge) .....	228
Figure 119 : Profil HPLC de séparation des fumonisines dans le sang du chat 1(en noir) et le chat x (en rouge). ....	228
Figure 120 : Profil HPLC de séparation des aflatoxines dans les organes du chaton 2 .....	230
Figure 121 : Profil HPLC de séparation de l'OTA dans les organes du chaton2, foie (en noir) et le rein (en rouge).....	230
Figure 122 : Profils d'adduits des organes des chatons mort-nés (rein, foie et cerveau) .....	232
Figure 123 : Le maïs à l'origine de l'intoxication .....	235
Figure 124 : Infiltration d'un liquide jaunâtre dans les méninges (Cerveau de cheval) (photo de gauche). Taille de la lésion au niveau du cerveau de cheval (photo de droite). ....	235

## Résultats et discussions

### Chapitre III

Figure 125 : Taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des concentrations du glutathion pur (à gauche) et du sélénométhionine (à droite) après 24h et 48h d'exposition. ....	241
Figure 126 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des concentrations du glutathion pur et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA) après 48h d'exposition. * différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ;@ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ;# différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA .....	241
Figure 127 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des concentrations du sélénométhionine pur et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA) après 48h d'exposition. * différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ;@ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ;# différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA .....	242
Figure 128 : Taux de survie des cellules humaines mammaires(MCF7) en fonction des concentrations du glutathion pur (à gauche) et du sélénométhionine (à droite) après 24h et 48h d'exposition.....	243
Figure 129 : Comparaison du taux de survie des cellules mammaires humaines (MCF7) en fonction des concentrations du glutathion pur et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA) après 24h et 48h d'exposition. * différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ;@ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ;# différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA .....	243
Figure 130 : Comparaison du taux de survie des cellules mammaires humaines (MCF7) en fonction des concentrations du sélénométhionine pur et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA) après 24h et 48h d'exposition. * différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ;@ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ;# différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA .....	244
Figure 131 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction du temps d'introduction des levures enrichies en glutathion et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA). * différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ;@ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ;# différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA .....	245
Figure 132 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction du temps d'introduction des levures sélénées et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA).* différence significative par	

rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ;@ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ;# différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA. ....	246
Figure 133 : Comparaison du taux de survie des cellules humaines de glandes mammaires (MCF7) en fonction du temps d'introduction des levures enrichies en glutathion et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA). * différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ;@ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ;# différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA ; & différence significative par rapport à exposition à levure GSH seule. ....	247
Figure 134 : Comparaison du taux de survie des cellules humaines de glandes mammaires (MCF7) en fonction du temps d'introduction des levures sélénisées et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA). * différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ;@ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ;# différence significative par rapport à exposition à levure GSH seule. ....	248
Figure 135 : Profils d'adduits à l'ADN des cellules rénales humaines HK2 exposées à l'OTA (10µM) en présence GSH (10µM) /SE (10µM) /Levures GSH (10µM) /levures sélénisée (10µM). ....	250
Figure 136 : Profils d'adduits à l'ADN des cellules rénales humaines HK2 exposées à la ZEA (10µM) en présence GSH (10µM) /SE(10µM) /Levures GSH(10µM) /levures sélénisée(10µM). ....	250
Figure 137 : Profils d'adduits à l'ADN des cellules rénales humaines HK2 exposées ZEA (10µM) + OTA(10µM) en présence GSH(10µM)/SE(10µM)/Levures GSH(10µM)/levures sélénisée(10µM) ....	251
Figure 138 : Profils d'adduits à l'ADN des cellules mammaires humaines (MCF7) exposées à l'OTA (10µM) en présence GSH (10µM)/SE (10µM)/Levures GSH (10µM)/levures sélénisée (10µM). ....	251
Figure 139 : Profils d'adduits à l'ADN des cellules mammaires humaines (MCF7) exposées à la ZEA en présence GSH (10µM)/SE (10µM)/Levures GSH (10µM)/levures sélénisée (10µM). ....	252
Figure 140 : Profils d'adduits à l'ADN des cellules humaines des glandes mammaires (MCF7) exposées à la ZEA+OTA en présence GSH (10µM) /SE(10µM) /Levures GSH(10µM)/levures sélénisée(10µM). ....	252
Figure 141 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à l'OTA ; OTA + GSH ; OTA + levure GSH. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min. ....	254
Figure 142 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à l'OTA ; OTA + SE ; OTA + levure SE. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min. ....	254
Figure 143 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à la ZEA ; ZEA + GSH ; ZEA + levure GSH. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min. ....	255
Figure 144 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à la ZEA ; ZEA + SE ; ZEA + levure SE. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min. ....	256
Figure 145 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à la ZEA+ OTA ; ZEA +OTA+ GSH ; ZEA +OTA+ levure GSH L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min. ....	257
Figure 146 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à la ZEA+ OTA ; ZEA +OTA+ SE ; ZEA +OTA+ levure SE. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min. ....	258
Figure 147 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules MCF7 exposées à l'OTA ; OTA + GSH ; OTA + levure GSH. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min. ....	259
Figure 148 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à l'OTA ; OTA + SE ; OTA + levure SE. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min. ....	260
Figure 149 : Comparaison des métabolites formés par les cellules MCF7 exposées à la ZEA ; ZEA + GSH ; ZEA + levure GSH. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min. ....	261
Figure 150 : Comparaison des métabolites formés par les cellules MCF7 exposées à la ; ZEA ; ZEA + SE ; ZEA + levure SE (bas). L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min. ....	261
Figure 151 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules MCF7 exposées à l'OTA+ ZEA ; OTA +ZEA + GSH ; OTA + ZEA + levure GSH. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min. ....	262
Figure 152 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules MCF7 exposées à l'OTA+ ZEA ; OTA +ZEA + SE ; OTA + ZEA + levure SE. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. ....	262



Figure 153 : Traitement des animaux .....	265
Figure 154 : Concentration d'OTA plasmatique (à gauche) ; concentration d'OTA dans la bile (à droite). ....	266
Figure 155 : Concentration d'OTA dans le foie (à gauche) ; concentration d'OTA dans le rein (à droite). ....	267
Figure 156 : Comparaison du taux d'OTA dans le rein et le foie des poulets.* significativement différent du groupe 2 (OTA seul). ....	268
Figure 157 : Schéma circulation réno-hépatique et entérohépatique des dérivés glutathions conjugués .....	268
Figure 158 : Le % d'adsorption de l'OTA (par rapport au témoin) par les parois de levures et les levures enrichies en antioxydants .....	269
Figure 159 : Profils d'adduits à l'ADN hépatique et rénal des animaux contrôles (sans OTA) et des animaux du groupe 2 (exposés à l'OTA seule). ....	270
Figure 160 : Profils d'adduits à l'ADN hépatique et rénale des animaux des groupes 13 (charbon actif) et 12 (levure vivante) .....	271
Figure 161 : Profils d'adduits à l'ADN hépatique et rénale des animaux exposés à l'OTA en présence de paroi de levure boulangère (gr10) ou de paroi de levure brassicole (gr 11). ....	272
Figure 162 : Profils d'adduits à l'ADN hépatique et rénale des animaux exposés à l'OTA en présence de levure enrichie glutathion (gr 3) ou levure sélénée (gr 6) .....	273
Figure 163 : Profil métabolique rénale et hépatique du groupe 2 (animaux exposés à l'OTA) .....	274
Figure 164 : Profil métabolique hépatique des groupes 13 (charbon actif) et 12 (levure vivante) .....	275
Figure 165 : Profil métabolique hépatique des groupes 10 (levure boulangère) et 11 (levure de bière) .....	276
Figure 166 : Profil métabolique hépatique des groupes 3 (levure GSH) et 6 (levure SE) .....	277
Figure 167 : Profil métabolique rénale des groupes 13 (charbon actif) et 12 (levure vivante) .....	278
Figure 168 : Profil des métabolites rénaux d'animaux exposées à l'OTA seul (gr2) ou en présence de paroi de levure boulangère (gr10) ou de paroi de levure brassicole (gr 11) .....	279
Figure 169 : Profil métabolique rénale des animaux exposés à l'OTA (gr 2) en présence de levure enrichie glutathion (GSH ; gr 3) ou levure sélénée (gr 6) .....	280

# Liste des tableaux

---

## Partie bibliographique 1

Tableau 1 : Effets de la ZEA chez les rongeurs et les lagomorphes (Gaumy et al., 2001).....	43
Tableau 2 : Structure chimique des fumonisines (d'après Pfohl-Leszkowicz, 1999) .....	49
Tableau 3 : Présence respective de FB1 et de FB2 dans les dérivés de maïs, à l'origine de mycotoxines (d'après Pfohl-Leszkowicz A, 1999) .....	49
Tableau 4 : Principaux champignons, mycotoxines et denrées associées (adapté de l'AFSSA, 2009) .....	64
Tableau 5 : les combinaisons de mycotoxines les plus fréquemment rencontrés dans les végétaux. (Adaptés de Speijers et al., 2004) .....	65
Tableau 6 : Les effets toxiques des mycotoxines sur le porc .....	65

## Partie bibliographique 2

Tableau 7 : Principales réactions de biotransformation. ....	70
--	----

## Partie bibliographique 3

Tableau 8 : Teneurs maximales (en µg/kg) en mycotoxines pour les produits alimentaires destinés à l'alimentation humaine. ....	85
Tableau 9 : Teneurs maximales (en µg/kg) en AFB <sub>1</sub> pour les aliments destinés à l'alimentation animale (Directive 2002 32/CE du 07 05 02) .....	87
Tableau 10 : Teneurs maximales recommandées (en µg/kg) en mycotoxines pour les aliments destinés à l'alimentation animale (recommandations 2006/576/CE) .....	87
Tableau 11 : Estimation du dégât économique en Millions de \$ Australiens, causé par différents champignons et les aflatoxines en Indonésie, aux Philippines et en Thaïlande en 1991 (Lubulwa et Davis, 1994) .....	90

## Partie bibliographique 4

Tableau 12 : Transformation de l'OTA par différents microorganismes. (Adapté de Jard, 2009) .....	96
Tableau 13 : Transformation de la ZEA par différents microorganismes (Adapté de Jard, 2009) .....	98
Tableau 14 : Capacité des glucomannanes issues de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> d'adsorber les mycotoxines (adapté de Yiannikouris & Joauany, 2002) .....	105
Tableau 15 : Composition et mode d'action des adsorbants commerciaux (Döll et al., 2004) .....	108
Tableau 16 : Effet sur la taille du foie et des reins, sur les lésions rénales et hépatiques chez les poulets âgé de 28 jours, nourris avec 2 ppm d'OTA (adapté de Tamames, 2009). ....	110
Tableau 17 : Effet sur le poids du foie et le poids corporel des truies nourris avec 6 ppm de DON et 1,2 ppm de ZEA pendant 21 jours (d'après Tamames, 2009) .....	111
Tableau 18 : Impact de l'OTA sur la peroxydation lipidique .....	112
Tableau 19 : Impact de l'AFB <sub>1</sub> sur la peroxydation lipidique .....	113

## Matériels et Méthodes

Tableau 20 : Paramètres d'absorbance des mycotoxines .....	130
Tableau 21 : Temps de rétention en minutes de l'OTA et des métabolites identifiés de l'OTA après séparation utilisant le gradient «1 ». ....	135
Tableau 22 : Temps de rétention en minutes de ZEA et de ses métabolites identifiés et l'OTA après séparation utilisant le gradient «2 ». ....	136
Tableau 23 : Limites de détection et de quantification de chaque mycotoxine .....	140

## Résultats et discussions

### Chapitre I

<i>Tableau 24 : Résultats d'analyse de l'OTA et CIT dans les céréales tchèques obtenus dans le laboratoire de Génie Chimique et le laboratoire de Kromeriz (République Tchèque).</i>	157
<i>Tableau 25 : Caractéristiques des deux méthodes d'extraction.</i>	158
<i>Tableau 26 : Taux des mycotoxines dans le riz.</i>	163
<i>Tableau 27 : Résultats des café dosettes.</i>	166
<i>Tableau 28 : Résultats du Café moulu.</i>	166
<i>Tableau 29 : Teneurs en mycotoxines dans les rations.</i>	171
<i>Tableau 30 : Teneurs d'OTA, ZEA et DON dans le lait.</i>	172
<i>Tableau 31 : Teneurs d'OTA et ZEA dans les rations.</i>	173
<i>Tableau 32 : Teneurs d'OTA et ZEA dans les échantillons de lait.</i>	174
<i>Tableau 33 : Principaux symptômes associés aux mycotoxines.</i>	176
<i>Tableau 34 : Analyse des croquettes de chat provenant d'éleveurs effectués en sous-traitance.</i>	177
<i>Tableau 35 : Analyse des croquettes de chat provenant d'éleveur effectué au sein de notre laboratoire.</i>	178
<i>Tableau 36 : Législation mycotoxines dans nourriture humaine et recommandation pour porc.</i>	179
<i>Tableau 37 : Analyse des croquettes de chat provenant d'industriel effectuées au sein de notre laboratoire.</i>	182
<i>Tableau 38 : Analyse de chaque constituant des croquettes de chat provenant d'industriel effectuées au sein de notre laboratoire.</i>	183
<i>Tableau 39 : Analyse des croquettes de chien provenant d'éleveur effectué en sous-traitance.</i>	185
<i>Tableau 40 : Analyse des croquettes de chien provenant d'éleveur effectué au sein de notre laboratoire.</i>	185
<i>Tableau 41 : Analyse des croquettes de chien provenant du commerce.</i>	189
<i>Tableau 42 : Coefficient de gravité.</i>	192
<i>Tableau 43 : Cotation et classement des croquettes en fonction des contaminations en mycotoxines.</i>	192
<i>Tableau 44 : Simulation de l'apport en plusieurs mycotoxines simultanément dans le cadre d'un menu d'une journée. Les toxines sont exprimées en ng/kg.</i>	199
<i>Tableau 45 : Simulation de l'apport en plusieurs mycotoxines simultanément dans une ration de chat.</i>	200
<i>Tableau 46 : Simulation de l'apport en plusieurs mycotoxines simultanément dans une ration de chien.</i>	201

## Résultats et discussions

### Chapitre II

<i>Tableau 47 : Analyse des croquettes (aliments de la mère du chaton 1).</i>	224
<i>Tableau 48 : Ingrédients des croquettes de la mère du chaton 1 provenant du 1<sup>er</sup> élevage.</i>	225
<i>Tableau 49 : Analyse des organes du chaton 1.</i>	225
<i>Tableau 50 : Analyse des croquettes (aliments du chat 1 et X).</i>	226
<i>Tableau 51 : Ingrédients de la nouvelle du 1<sup>er</sup> élevage.</i>	227
<i>Tableau 52 : Analyse du sang du chat 1 et chat X.</i>	227
<i>Tableau 53 : Analyse des croquettes (aliments du chat 1 et X).</i>	228
<i>Tableau 54 : Analyse du sang du chat 3.</i>	229
<i>Tableau 55 : Analyse des organes chaton 3.</i>	229
<i>Tableau 56 : Analyse des croquettes (aliments de la femelle ayant eu le chaton2).</i>	229
<i>Tableau 57 : Analyse des organes chaton 2.</i>	230
<i>Tableau 58 : Taux des mycotoxines dans la luzerne et le sang du cheval.</i>	233
<i>Tableau 59 : Taux des mycotoxines dans les échantillons de foin.</i>	234
<i>Tableau 60 : Analyse des Fumonisin.</i>	236
<i>Tableau 61 : Analyse de l'ochratoxine A et la citrinine.</i>	237

## Résultats et discussions

### Chapitre III

<i>Tableau 62 : Groupe d'animaux testés.</i>	265
<i>Tableau 63 : Concentration d'OTA dans les foies et les reins des poulets.</i>	267
<i>Tableau 64 : Taux des mannanes et glucanes dans les produits de levures testés.</i>	269
<i>Tableau 65 : Récapitulatif des métabolites formés dans le foie et le rein des poulets.</i>	282
<i>Tableau 66 : Récapitulatif des adduits formés dans le foie et le rein des poulets.</i>	283

## Liste des abréviations

---

<sup>32</sup> P	Phosphore 32
3'-dGMP	3'-monophosphate désoxyguanosine
AA	Acide arachidonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADYs	Levure sèche active
AF	Aflatoxines
AFB	Aflatoxine B
AFG	Aflatoxine G
AFM1	Aflatoxine M1
ALP	Alcaline phosphatase
ARN	Acide ribonucléique
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine tri phosphate
Aw	Activité de l'eau
BEN	Néphropathie endémique des Balkans
CHA	Choléstyramine
CIRC	Centre international de recherche contre le cancer (=IARC)
CIT	Citrinine
CL50	Concentration létale 50
COX	Cyclooxygénase = PGHS
CPDA	Comité permanent des denrées alimentaires
CPM	Coups par minute
CSAH	Comité scientifique de l'alimentation humaine
CYP	Cytochrome P450
DHT	Dose hebdomadaire tolérable
DJT	Dose journalière tolérable
DL50	Dose létale 50
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DO	Densité optique
DON	Désoxynivalénol
DPM	Désintégrations par minute
DVS	Dose Virtuellement Sûre
ELISA	<i>Enzyme Linked-Immuno Sorbent Assay</i>
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FB	Fumonisine
FDA	US Food and Drug Administration
gr	Groupe
GSH	Glutathion
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
HCl	Acide chlorhydrique
HSCAS	Hydrated sodium calcium aluminosilicates

HepG2	Hépatome d'origine humaine
HK2	Cellules rénales humaines
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IAC	Colonne d'immunoaffinité
INC	Institut National de la Consommation
IR	Infra-rouge
JECFA	Comité mixte FAO/OMS d'experts sur les additifs alimentaires
LIPOX	Lipoxygénase
LAB	Bactérie lactique
LDH	Lactate déshydrogénase
LLC-PK1	Lignée cellulaire de rein de porc
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
LGSH	Levure enrichie en glutathion
LS	Levure enrichie en séléniométhionine
LIPOX	Lipoxygénase
MCF7	Cellule mammaire humaine
MDA	Malondialdéhyde
MESNA	2-mercaptoéthane sulfonate
MTT	Sel de tétrazolium
MN	Nucléase de staphylocoque
MS	Spectrométrie de masse
ms	Matière sèche
NA	Non analysé
NAC	N-acétyl-cystéine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite
ND	Non détecté
NP1	Nucléase P1
OHOA	Hydroxy-ochratoxine A
OK	Cellule rénale d'opossum
OMS	Organisation mondiale de la santé
OPA	ortho-phthaldialdéhyde
OP-OTA	Forme ouverte de l'ochratoxine A
OTA	Ochratoxine A
OTB	Ochratoxine B
OT-Br	Ochratoxine Bromé
OTC	Ochratoxine C
OTHQ	Ochratoxine hydroquinone
OTQ	Ochratoxine quinone
OS	Stress oxydatif
PBS	Tampon phosphate salin*
Pc	Poids coporel
PMFS	Phényl méthyl fluorosulfonid (fluorure de phényl-méthyl-sulfonate)
PEI	Polyéthylène imine

PGHS	Prostaglandine H synthétase = COX
PM	Poids moléculaire
Ppm	Partie par million
ROS	Espèces activés de l'oxygène
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Se	Sélénium
SeMet	Sélenométhionine
S9	Surnageant 9000g
SPD	Phosphodiesterase de rate
SVF	Sérum de veau foetal
T-2	Toxine T2
UE	Union européenne
UV	Ultra violet
WI	Cellules épithéliales bronchiques humaines
ZEA	Zéaralénone
$\alpha$ -ZOL	$\alpha$ -zéaralénone
$\beta$ -ZOL	$\beta$ -zéaralénone

## Publications

---

1. Frédéric Violleau, **Kheira Hadjeba**, Joël Albet, Roland Cazalis, Olivier Surel (2008). Effect of Oxidative Treatment on Corn Seed Germination Kinetics. *Ozone: Science & Engineering. The Journal of the International Ozone Association*. 30:6,418-422.
2. Polisenska I., Pfohl-Leszkowicz A., **Hadjeba K.**, Dohnal V., Jirsa O. Denesova O., Jezkova A. and Macharackova P. (2010) Occurrence of Ochratoxin A and citrinin in Czech cereals- Comparison of HPLC and ELISA methods for Ochratoxin A detection. *Food Additives and Contaminants*. Vol 27, N°11, 1545-1557.
3. Claire Joannis-Cassan, Mariana Tozlovanu, **Kheira Hadjeba-Medjdoub**, Nathalie Ballet, and Annie Pfohl-Leszkowicz. (2011). Binding of Zearalenone, Aflatoxin B<sub>1</sub>, and Ochratoxin A by Yeast-Based Products: A Method for Quantification of Adsorption Performance. *Journal of Food Protection*, Volume 74, N° 7, 1175-1185(11)
4. **Kheira Hadjeba-Medjdoub**, Mariana Tozlovanu, Annie Pfohl-Leszkowicz, Christine Frenette, Robert J. Paugh, and Richard A. Manderville. (2012). Structure-Activity Relationships Imply Different Mechanisms of Action for Ochratoxin A-Mediated Cytotoxicity and Genotoxicity. *Chem Research Toxicology*. Vol 25, N° 1, 181-190.
5. **Hadjeba-Medjdoub K.**, El Adlouni, C., Manderville, R.A., and Pfohl-Leszkowicz, A. (2012). Admixture of Ochratoxin A and Fumonisin B<sub>1</sub> Stimulates Proliferation and a Synergistic Increase in Mitogen-Activated Protein Kinase Activity in Human Kidney Cells. *Chem Res Toxicol* (soumis).
6. Faucet-Marquis V, **Hadjeba-Medjdoub K.**, Joannis-Cassan C, Ballet N & Pfohl-Leszkowicz A (2012). Development of an *in vitro* method for the prediction of mycotoxin adsorption on yeast based products: case of zearalenone, ochratoxin A and Aflatoxin B<sub>1</sub> (en cours de soumission).
7. **Hadjeba-Medjdoub K.**, Faucet-Marquis V, Polisenska I, Dohnal V & Pfohl-Leszkowicz A (2012) Mycotoxins contamination of cat petfood- correlation with reduced fertility and stillbirth (en cours de soumission).
8. **K.Hadjeba-Medjdoub**. Saviez vous que les aliments peuvent être source de toxines naturelles toxigènes ? (article de vulgarisation) Journée de rencontre des jeunes chercheurs de l'association de recherche contre le cancer (ARC). 21 octobre 2010. PARIS.

## Communications à des congrès internationaux

---

1. **Hadjeba-Medjdoub K.**, Tozlovanu-Fergane M., Faucet-Marquis V., Peraica M., Manderville R., Pfohl-Leszkowicz A (2010). Synergistic effect of citrinin, fumonisin and ochratoxin A on cell viability and genotoxicity: role in human nephropathy and urothelial tract tumours. **VI Latinamerican congress of mycotoxicology and II International symposium on fungal and algal toxins in industry**, June 27- July 1<sup>st</sup> 2010 Merida-Yucatan, Mexique.
2. Tozlovanu M, **Hadjeba-Medjdoub K**, Joannis-Cassan C, Ballet N, and Pfohl-Leszkowicz A. Development of a method allowing screening of mycotoxin adsorption. **International mycotoxin conference “Global Mycotoxin Reduction Strategies: Research Advances in Asia and the Pacific Rim”**, 1-4 decembre 2010 Pennang, Malaysia.
3. **Hadjeba-Medjdoub K**, Schrickx J, Ballet N, Fink-Gremmels J, Pfohl-Leszkowicz A. Impact of adjunction of yeast cell walls or live yeast in feed to decrease ochratoxin A genotoxicity in poultry. **International mycotoxin conference “Global Mycotoxin Reduction Strategies: Research Advances in Asia and the Pacific Rim”**, 1-4 decembre 2010 Pennang, Malaysia.
4. Tozlovanu M, **Hadjeba-Medjdoub K**, Peraica M, Stefanovic V, Manderville RA & Pfohl-Leszkowicz A. Evaluation of the Daily Intake of Carcinogenic Mycotoxins- Molecular evidence of synergistic effects, **4<sup>th</sup> International symposium mycotoxins: Challenges and Perspectives**, 24 Mai 2011, Ghent, Belgique.
5. **Hadjeba-Medjdoub K**, Tozlovanu M, Schrickx J, Ballet N, Fink-Gremmels J, Pfohl-Leszkowicz A. Ochratoxin A genotoxicity reduction in kidney and liver of poultry fed OTA contaminated feed supplemented by yeast. **International conference ‘Power of fungi 2011’**, Oct 2011, Primosten, Croatia.
6. **Hadjeba-Medjdoub K**, Faucet-Marquis, Tozlovanu M, Peraica M, Manderville, RA, Pfohl-Leszkowicz A. Synergistic effect of three nephrotoxic and carcinogenic mycotoxins (citrinin, fumonisin, ochratoxin A) on human kidney cells viability and genotoxicity. **International conference ‘Power of fungi 2011’**, Oct 2011, Primosten, Croatia.
7. **Hadjeba-Medjdoub K**, Schrickx J, Ballet N, Fink-Gremmels J, Pfohl-Leszkowicz A. Detoxification efficiency of yeast by products added to poultry feed to decrease ochratoxin A genotoxicity in liver and in kidney, **ISM 2011 Conference “Strategies to reduce the impact of mycotoxins in Latin America in a global context ”** 15-18 Nov 2011, Mendoza, Argentine.

### AUTRES PRESENTATIONS ORALES

1. **Hadjeba-Medjdoub K**, (2008). Etude moléculaire de l'effet d'une multi-contamination par l'OTA, FB1 et CIT sur le développement de cancer des voies urinaires. **Séminaire du laboratoire de génie chimique**. 17 juillet 2008, l'ENSAT, Auzeville Tolosane.
2. **Hadjeba-Medjdoub K**, (2010) Etude de l'effet d'une multi-contamination par les mycotoxines sur la baisse de fertilité chez les animaux de compagnie. **Séminaire du Département Bioprocédés et Systèmes Microbiens**. 5 Mars 2010, laboratoire de génie chimique, Labège.



## **POSTERS PRESENTES A DES CONGRES INTERNATIONAUX**

1. **Hadjeba-Medjdoub K**, Tozlovanu-Fergane M, Peraica M, Manderville R & Pfohl-Leszkowicz A (2009). Molecular evidence of synergistic effect of citrinine, fumonisin & ochratoxin A, nephrotoxic mycotoxins. **Symposium Aliment Santé (SAS 2009), Toulouse 21-22 janvier 2009.**
2. Mariana Tozlovanu, Virginie Faucet-Marquis, **Kheira Hadjeba-Medjdoub**, Maja Peraica, Richard Manderville, Annie Pfohl-leszkowicz (2009) New molecular and field evidence for the implication of mycotoxins in nephrotoxicity and urinary tract tumours. **Gordon conference 'mycotoxin & phycotoxin', Colby, USA 21-25 june, 2009.**
3. **K.Hadjeba-Medjdoub** , M. Tozlovanu-Fergane , V. Faucet-Marquis , M. Peraica, R. Manderville , A. Pfohl-Leszkowicz A (2009) molecular evidence of synergistic effect of citrinin, fumonisin and ochratoxin a: role in human nephropathy and urothelial tract tumours. **X<sup>th</sup> international conference on environmental mutagens firenze, italy - august 20-25, 2009 Florence, Italie.**
4. **Hadjeba-Medjdoub K**, Faucet-Marquis V, Joannis-Cassan C, Ballet N, Pfohl-Leszkowicz A (2009) Analysis of the factors influencing mycotoxin adsorption on yeast/development of a method allowing screening. **International Society for Mycotoxin, ISM 2009,Worldwide mycotoxin reduction in food and feed, Tulln, Autriche, 9-11 septembre 2009.**
5. **Hadjeba-Medjdoub K**,\_Tozlovanu-Fergane M, Polisenska I, Pfohl-leszkowicz A (2009) Occurrence of mycotoxins in domestic (cat) petfood: correlation with reduced fertility and stillbirth. **International Society for Mycotoxin, ISM 2009,Worldwide mycotoxin reduction in food and feed, Tulln, Autriche, 9-11 septembre 2009.**
6. Polisenska I, Pfohl-Leszkowicz A, Dohnal V, **Hadjeba-Medjdoub K**, Jirsa O, Jezkova A (2009) Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Czech republic /Comparison of HPLC and elisa methods. **International Society for Mycotoxin, ISM 2009,Worldwide mycotoxin reduction in food and feed, Tulln, Autriche, 9-11 septembre 2009.**
7. **Hadjeba-Medjdoub K**, Tozlovanu M, Joannis-Cassan C, Roussos S, Ballet N & Pfohl-Leszkowicz A (2010). Development of a method allowing screening of mycotoxin adsorption on yeast by products. **4th International congress on Bioprocess in food industries, 5-9 Octobre 2010 Curitiba, Brésil.**
8. Tozlovanu M, **Hadjeba-Medjdoub K**, Peraica M, Stefanovic V, Manderville R & Pfohl-Leszkowicz A (2010) Daily Intake of Carcinogenic and Reprotoxic Mycotoxins- Molecular evidence of synergistic effects. **6th Conference The World Mycotoxin forum, 8-10 novembre 2010, Noordwijkerhout, The Netherlands.**
9. **Hadjeba-Medjdoub K**, Tozlovanu M, Joannis-Cassan C, Ballet N, J Schricx, Fink-Gremmels J & Pfohl-Leszkowicz A (2010). Comparison of the capacities of several yeast products to adsorb ochratoxin A-Relation with decrease of OTA genotoxicity. **6th Conference The World Mycotoxin forum, 8-10 novembre 2010, Noordwijkerhout, The Netherlands.**
10. **Kheira Hadjeba-Medjdoub**, Mariana Tozlovanu, Jan Schrickx, Nathalie Ballet, Johanna Fink-Gremmels, Annie Pfohl-Leszkowicz. Adjunction of yeast cell walls or live yeast in feed of poultry decrease ochratoxin A genotoxicity. **Mycored Africa, 1-4 April 2011, Cape town, South Africa.**

11. Mariana Tozlovanu, **Kheira Hadjeba-Medjdoub**, Maja Peraica, Vladisav Stefanovic, Richard Manderville & Annie Pfohl-Leszkowicz. Evaluation of the Daily Intake of Carcinogenic Mycotoxins- Molecular evidence of synergistic effects. **Mycored Africa, 1-4 April 2011, Cape town, South Africa.**
12. **Kheira Hadjeba-Medjdoub**, Mariana Tozlovanu, Jan Schrickx, Nathalie Ballet, Johanna Fink-Gremmels, Annie Pfohl-Leszkowicz. Decrease of ochratoxin A genotoxicity in poultry by addition of yeast by products in feed. **4<sup>th</sup> International symposium mycotoxins: Challenges and Perspectives, 24 Mai 2011, Ghent, Belgique.**
13. **Kheira Hadjeba-Medjdoub**, Jan Schrickx, Nathalie Ballet, Johana Fink-Gremmels, Annie Pfohl-Leszkowicz. Adjunction of yeast cell walls or live yeast decrease ochratoxin A genotoxicity in poultry. **33<sup>rd</sup> Mycotoxin workshop 2011, 30 Mai-1er Juin 2011, Freising, Allemagne.**
14. **Hadjeba-Medjdoub K**, Faucet-Marquis V, Tozlovanu M, Peraica M, Manderville RA, Pfohl-Leszkowicz A. Evaluation of simultaneous presence of three nephrotoxic and carcinogenic mycotoxins(citrinin, fumonisin, ochratoxin) on human kidney cells viability and genotoxicity **International toxicology of mixture 21-23 October Arlington, USA.**
15. **Hadjeba-Medjdoub K**, Tozlovanu M, Schrickx J, Ballet N, Fink-Gremmels J, Pfohl-Leszkowicz A. Adjunction of yeast cell walls or live yeast in feed of poultry decrease ochratoxin A genotoxicity **ISM 2011 Conference "Strategies to reduce the impact of mycotoxins in Latin America in a global context " 15-18 Nov 2011, Mendoza, Argentine.**

#### **AUTRES POSTERS**

1. **K.Hadjeba-Medjdoub**, M. Tozlovanu-Fergane, M, Peraica M, Manderville R & Pfohl-Leszkowicz . Etude des effets synergiques de multi-contamination en mycotoxines (ochratoxine A, zéaralénone, fumonisine, citrinine (2011). **Journée « Mycotoxines » 18 janvier 2011, l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.**
2. **K.Hadjeba-Medjdoub**, J.Schrickx, N. Ballet, J. Fink-Gremmels et A.Pfohl-Leszkowicz. Diminution de l'effet génotoxique de l'ochratoxine A par adjonction de dérivés de levures dans la nourriture des volailles (2011). **Journée « Mycotoxines » 18 janvier 2011, l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.**
3. **K.Hadjeba-Medjdoub**, M. Tozlovanu-Fergane, I. Polisenska, V. Dohnal, A. Pfohl-Leszkowicz. Reduced fertility and stillbirth in domestic animals (cat) related to mycotoxins in pet food. **Journée de l'école doctorale SEVAB. Décembre 2009, INRA, Castanet-Tolosane.**

# Introduction

---

Lors de la croissance des végétaux et de leur stockage, les aliments peuvent être un substrat pour le développement de moisissures, qui souvent sous certaines conditions d'humidité peuvent produire des mycotoxines. Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par une grande variété de moisissures principalement les genres *Fusarium spp*, *Aspergillus spp* ou *Penicillium spp*, se développant sur différents types d'aliments bruts (céréales, oléoprotéagineux, fruits, noix, amandes, grains, fourrages) et dans des situations écologiques très diverses. Du fait de leur transfert dans la chaîne alimentaire végétale et animale, elles se retrouvent dans l'alimentation humaine.

De plus, les mycotoxines sont des composés très stables durant le stockage mais également au cours des traitements de transformation. Elles sont thermostables et ne sont pas détruites par les procédés technologiques de préparation des aliments comme la cuisson et la stérilisation. Les mycotoxines restent donc présentes dans l'aliment « fini », même après la disparition des moisissures (CAST, 2003). Elles sont retrouvées dans les céréales de petit déjeuner (Molinié *et al.*, 2005 ; Ibáñez-Vea *et al.*, 2011) dans les pâtes (Raiola *et al.*, 2012), dans le café (Tozlovanu & Pfohl-Leszkowicz, 2010). L'ochratoxine A (OTA) est retrouvée dans une large gamme de produits alimentaires (céréales, vin, café, cacao, épices, fruits secs) (Ozden *et al.*, 2012; Battacone *et al.*, 2010).

De part leur grande stabilité thermique, les mycotoxines constituent un danger pour la santé de l'Homme et des animaux. Elles constituent un groupe de substances toxiques présentant notamment des activités mutagènes, cancérigènes, tératogènes, immunotoxinogènes, et de perturbateurs endocriniens. Elles affectent les animaux d'élevage consommant les aliments bruts contaminés. Leur capacité à se lier aux protéines plasmatiques et leur lipophilie en font des toxiques capables de persister dans l'organisme.

Des similitudes ont été observées entre la néphropathie porcine et aviaire en Bulgarie et la néphropathie endémique des Blakans (Stoev, 2008 ; Stoev *et al.*, 2010). Certaines mycotoxines comme l'OTA et la FB<sub>1</sub> semblent être impliquées (Stoev *et al.*, 2011).

La zéaralénone (ZEA) se trouve aussi fréquemment dans de nombreux produits alimentaires et perturbe la reproduction des porcs entre autre. La ZEA et ses métabolites peuvent agir en tant que perturbateurs endocriniens en altérant la production d'hormones (Frizzell *et al.*, 2011). La ZEA et ses dérivés modifient plusieurs paramètres de la réponse cellulaire humorale et immunitaire chez le porc (Marin *et al.*, 2011).

Ces mycotoxines se retrouvent assez souvent en co-contamination et provoquent de graves problèmes de santé publique et économique. La présence simultanée de FB<sub>1</sub> et d'AFB<sub>1</sub> conduit à une augmentation du cancer hépatique dû au fait de l'effet promoteur de la FB<sub>1</sub>, vis-à-vis de l'effet initiateur de l'AFB<sub>1</sub> ainsi qu'au fait que la FB<sub>1</sub> par son action d'initiateur rend les cellules hépatiques plus sensibles (Gelderblom *et al.*, 2008).

Les mycotoxines, et en particulier celles qui sont cancérigènes, devraient être exclues des aliments. La législation sur les mycotoxines se met progressivement en place, mais tous les pays n'en sont pas au même stade, car la fixation de doses maximales et la mise en place d'une législation dépendent de plusieurs facteurs à la fois scientifiques et socio-économiques. Dans l'Union Européenne, le règlement 2006/1881/CE fixe des teneurs maximales pour certaines mycotoxines dans les denrées alimentaires pour l'alimentation humaine. En ce qui concerne les aliments pour animaux, la directive 2002/32/CE modifiée fixe des teneurs maximales uniquement pour l'aflatoxine B<sub>1</sub>. Pour les autres mycotoxines, des teneurs maximales sont simplement recommandées mais pas encore imposées. Aucune législation ne prend en compte le risque de co-contaminations.

La mise en place de mesures de prévention (bonnes pratiques agricoles incluant le choix des variétés, suivi tout au long de la chaîne alimentaire ...), peut parfois se révéler insuffisante, d'où le besoin de trouver des moyens de désactivation après les traitements technologiques. Différentes procédures de décontamination ont été explorées (physiques, chimiques et biologiques).

Si les effets de certaines substances adsorbantes sont bien documentés *in vitro*, leur efficacité *in vivo* en tant qu'additif alimentaire n'est pas toujours aussi claire. Plusieurs explications peuvent être avancées. Le faible nombre d'études et leur disparité (composition des additifs et teneur en principe actif, durée d'administration, paramètre mesuré...) peut expliquer les discordances concernant l'efficacité des additifs adsorbants. Par ailleurs, depuis la fabrication de l'aliment jusqu'à leur absorption intestinale, les additifs sont soumis à une myriade d'événements qui peuvent réduire leur activité. Des études pharmacocinétiques sont également nécessaires pour connaître le devenir de ces additifs dans l'organisme, et ainsi comprendre leurs effets.

La décontamination biologique des mycotoxines en utilisant des micro-organismes est l'une des stratégies bien connues pour la gestion des mycotoxines dans les denrées alimentaires et aliments pour animaux.

L'intérêt se porte actuellement vers l'utilisation de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) et de produits dérivés comme les constituants de leur paroi. Contrairement aux argiles, les constituants de levures présentent l'avantage d'être biodégradables et les taux d'incorporation proposés pour l'alimentation sont moindres. Par exemple il a été montré que l'ajout d'extraits de parois de levures (YCW) de *Saccharomyces cerevisiae* réduit l'absorption d'AFB<sub>1</sub> et augmente l'élimination de l'AFB<sub>1</sub> et l'AFM<sub>1</sub> dans les fèces de brebis (Firmin *et al.*, 2011).

Cependant aucune de ces approches n'est universelle et ne peut garantir l'élimination totale de toutes les mycotoxines.

Les équipes de recherche travaillant dans le domaine de la décontamination des mycotoxines sont convaincus que la combinaison d'agents adsorbants et de méthode de biotransformation des mycotoxines permettrait de garantir un traitement plus efficace contre les mycotoxines dans les aliments contaminés (Schatzmayr *et al.*, 2003 ; 2004 ; 2008).

Étant donné que certaines mycotoxines sont connues pour produire des dommages membranaires suite à une augmentation de la peroxydation lipidique, les propriétés protectrices des antioxydants, ont été envisagées.

Le sélénium (Se), oligo-élément essentiel, est un constituant des sélénoprotéines qui interviennent dans de nombreux processus physiologiques. Parmi celles-ci, la glutathion peroxydase (GSH-Px) joue un rôle fondamental dans la protection des cellules contre les agents oxydants, lesquels endommagent irréversiblement l'intégrité des membranes cellulaires (Blood *et al.*, 1979). **L'intérêt du glutathion, et du sélénium a été étudié au cours de cette thèse.**

Le but de cette thèse était dans un premier temps, faire un état de lieux de co-contamination dans l'alimentation humaine et animale. Par la suite, notre travail a porté sur l'étude des effets toxiques de la multi-contamination *in vitro* et *in vivo*. Dans un second temps, nous avons testé la désactivation de deux mycotoxines (OTA et ZEA) par les levures enrichies en glutathion (GSH) ou en sélénométhionine (SeMet).

Dans ce manuscrit, le premier volet est consacré à la revue bibliographique subdivisée en 4 parties portant (i) sur les mycotoxines, (ii) le devenir des substances toxiques (iii) la relation avec le développement de cancer (iv) les levures et les antioxydants.

Le deuxième volet présente l'approche expérimentale utilisée.

Le troisième volet est consacré aux résultats, partie subdivisée en (i) étude des cocontaminations dans divers produits alimentaires (ii) étude du mécanisme d'action des mycotoxines en culture cellulaire et sur des animaux (iii) Désactivation de l'OTA et la ZEA par des levures et produits de levures enrichies en GSH & SeMet.

Dans la conclusion, nous mettrons en avant que l'ensemble de cette thèse a permis d'apporter des arguments sur le risque de la multi-contamination en mycotoxines et les moyens de détoxification en utilisant des parois de levures et des levures enrichies en antioxydants.

# **Analyse bibliographique**

---

## **Partie 1**

### **Les mycotoxines**

## 1. Généralités sur les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par les moisissures. Ce sont des molécules de faible poids moléculaire ( $PM < 1000$  Da), d'origines chimiques diverses (dérivés d'acides aminés, des polyacétoacides, des acides gras ou des terpènes) (Betina, 1994). Une vingtaine sont présentes dans les aliments en quantité suffisante pour affecter la santé de l'homme et des animaux (JEFCA, 1999 ; Pfohl-Leszkowicz, 1999).

On peut aussi classer les mycotoxines plus simplement selon leurs principaux effets toxiques. Les plus importantes du point de vue agro-alimentaire et sanitaire sont les aflatoxines, les ochratoxines, la patuline, les fumonisines, la zéaralène et les trichothécènes.

Elles sont présentes dans de nombreux produits de l'alimentation humaine et animale. En fonction du type de toxine et de la dose ingérée (Peraica, 1999; Castegnaro & Pfohl-Leszkowicz, 2002), les effets biologiques sont à l'origine de dommages au niveau du foie, du rein, du cerveau. Les mycotoxines peuvent être mutagènes, tératogènes, cancérigènes et immunotoxiques.

Elles ne sont que peu, ou pas, dégradées au cours des procédés de transformation des aliments (cuisson, fermentation, torréfaction...). Elles sont par conséquent retrouvées dans les produits dérivés finis.

## 2. L'ochratoxine A (OTA)

### 2.1 Origine et structure de l'OTA

L'ochratoxine A est constituée d'une molécule de 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4 dihydro isocoumarine liée par une liaison peptidique, au niveau de son groupement carboxyle en C7, au groupement amine de la L- $\beta$ -phénylalanine. Il existe d'autres ochratoxines comme l'ochratoxine B (OTB) qui est le dérivé non chloré de l'OTA, l'ochratoxine C (OTC) qui est l'ester éthylique et l'ochratoxine  $\alpha$  ( $OT\alpha$ ) qui est le dérivé isocoumarique obtenu à la suite de l'hydrolyse de la liaison peptidique avec élimination de la phénylalanine. Leurs structures sont représentées dans la figure 1.

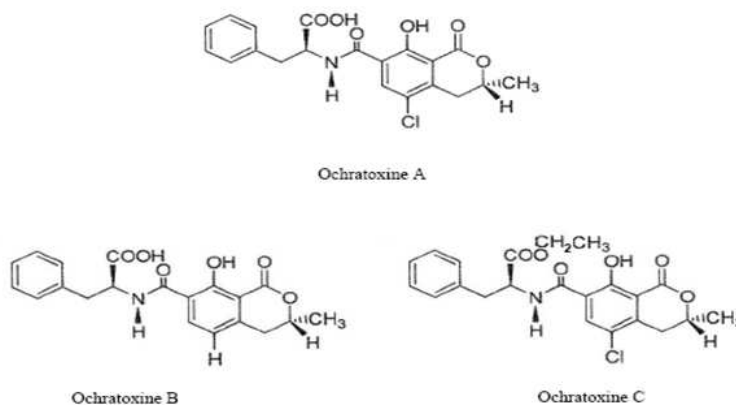


Figure 1: Structure des ochratoxines A, B et C

### 2.2 Exposition de l'homme

L'OTA a d'abord été détectée comme contaminant naturel du maïs. Elle contamine toutes les céréales (notamment le blé, l'orge...) et certaines graines (riz, haricots, café, soja, cacao...). On note sa présence dans les produits dérivés des céréales comme la farine, le pain, les pâtes, la bière (Pfohl-Leszkowicz, 1999). On la retrouve également dans le vin et les jus de raisin mais aussi dans les produits d'origine animale tels que la viande et le lait (Breitholtz-Emanuelson *et al.*, 1993 ; Pattono *et al.*, 2011). Les concentrations en OTA retrouvées dans les aliments varient de quelques ng/kg jusqu'à plusieurs dizaines de mg/kg.

Dans les pays africains comme la côte d'ivoire, la Guinée, le Nigeria ou le Cameroun, la poudre de cacao est contaminée par des mycotoxines suite au développement d'*Aspergillii*, des concentrations d'OTA supérieures à 4mg/kg de poudre de cacao ont été mesurées. *A.ochraceus* et *A.niger* sont retrouvés dans plus de la moitié des échantillons (Aroyeun & Adegoke, 2007). La contamination du café, du vin, du maïs fermenté est également importante dans les pays africains (Wagacha & Muthomi, 2008).

L'OTA s'accumule dans la viande suite à l'exposition des animaux *via* l'alimentation. Jørgensen (1998) rapporte la présence d'OTA dans les muscles de porc et de volaille, ainsi que dans les abats. De même, elle a été mise en évidence dans le sang et les tissus d'animaux d'élevage, où elle s'accumule au niveau rénal et hépatique (Gareis, 1996 ; Hult *et al.*, 1980 ; Hult *et al.*, 1984 ; Curtui *et al.*, 2001). L'OTA peut également être retrouvée dans les volailles (Elling *et al.*, 1975 ; Micco *et al.*, 1987 ; Bauer *et al.*, 1988).

L'OTA a été retrouvée dans des aliments pour bébés à base de céréales (Araguas *et al.*, 2005). L'OTA peut être transférée dans le lait, contribuant à l'exposition des petits au cours de l'allaitement (Ferrufino-Guardia *et al.*, 2000). L'OTA a été retrouvée dans du lait de vache (Breitholz-Emmanuelsson *et al.*, 1993) mais également dans le lait humain (Micco *et al.*, 1991, 1995 ; Breitholtz-Emanuelsson *et al.*, 1993 ; Zimmerli & Dick, 1995 ; Miraglia *et al.*, 1995 ; Skaug *et al.*, 1998). Une étude au Sierra Leone a montré que 35% du lait maternel était contaminé. Dans 22% des échantillons, il y avait aussi présence d'aflatoxine B<sub>1</sub>. Des traces d'OTA dans le lait humain (0,017-0,030 ng/ml) ont été mesurées dans 4/36 échantillons (Gareis *et al.*, 1988). En revanche, Rosner *et al.* (2000) n'ont pas détecté d'OTA dans 27 échantillons de lait maternel analysés (<0,06 ng/ml). Une étude norvégienne montrant la présence d'OTA dans le lait humain a établi une corrélation positive entre une consommation élevée de pâté de foie et de gâteau et la détection d'OTA dans le lait. Dans cette étude, 17/80 échantillons contenaient de l'OTA dans une gamme de 0,01 à 0,182 ng/ml (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). En Suède, 23/40 échantillons de lait humain contiennent de l'OTA à des concentrations de 0,01 à 0,04 ng/ml d'OTA. En Hongrie, 38/92 des échantillons de lait humains sont contaminés par l'OTA dans la gamme de 0,2-7,3 ng/ml. Les concentrations d'OTA dans le lait maternel d'Italie sont les plus élevées: 9/50 et 22/211 échantillons atteignent les concentrations de 1,7 à 6,6 et de 0,1 à 12 ng/ml, respectivement. Les concentrations d'OTA dans le lait maternel de trois mères italiennes sur 1 semaine ont été comparées avec l'OTA dans différents aliments. Le lait contenait de l'OTA à des taux de 0,08 à 0,54 ng/l, bien que les concentrations d'OTA dans les aliments soient assez faibles (0,03 à 1 µg/kg) (Pfohl-Leszkowicz et Manderville, 2007). En Australie, 2 /100 des échantillons de lait contenaient de l'OTA (3 à 3,6 ng/ml). L'OTA est détectée dans le lait humain en provenance du Brésil 2/50 échantillons à des concentrations allant de 0,01 et 0,2 ng/ml. Postupolski et Karlowski (1998) ont trouvé de l'OTA dans le lait maternel de femmes polonaises à des niveaux similaires à ceux trouvés dans des échantillons de lait en provenance d'Allemagne, de Suède et de Suisse.

Les moisissures produisant l'OTA, peuvent également produire d'autres toxines ou cohabiter avec d'autres moisissures produisant des toxines différentes comme la citrinine (CIT) produite par des *Penicillia* ou des aflatoxines produites par *Aspergillus flavus*. La présence simultanée de CIT et d'OTA se produit assez fréquemment dans les céréales lors du stockage aussi bien dans les pays des Balkans qu'en France (Pfohl-Leszkowicz & Manderville 2007 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2008a). Ces toxines peuvent être associées dans les mêmes aliments à de l'aflatoxine et/ou de la fumonisine (Molinié *et al.*, 2005).

L'OTA est également retrouvée au terme des procédés de transformations nécessitant le passage de la matière première à des températures élevées comme la torréfaction (250°C pendant 150 secondes). Cette étape de torréfaction ne permet de réduire que légèrement le taux d'OTA dans le café torréfié. L'OTA est par la suite retrouvée dans le breuvage (Studer-Rohr *et al.*, 1995, Tozlovanu & Pfohl-Leszkowicz, 2010). L'OTA est également retrouvée dans le café soluble (MAFF, 1996 ; Lombaert *et al.*, 2002).

La contamination par l'OTA des animaux et des humains s'effectue lors de la consommation des aliments, mais peut aussi survenir lors de l'inhalation (pour une revue voir Pfohl-Leszkowicz & Manderville 2007 ; Iavicoli *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2008). L'analyse de poussières dans des conduites de chauffage de maison, a été ainsi réalisée, les animaux domestiques y présentaient des



signes d'intoxication semblables à ceux de l'OTA. Des taux allant jusqu'à 1500 ppb ont été mesurés (Richard *et al.*, 1999). Une étude a montré des résultats similaires pour des poussières prélevées dans des fermes (Skaug *et al.*, 2001). Ceci se traduit par la présence d'OTA dans le sang de travailleurs agricoles (Degen *et al.*, 1997).

En Europe, la part respective estimée de plusieurs denrées (blé, maïs, avoine, sorgho, seigle, orge, riz, café vert, café torréfié, bière, vin, cacao et dérivés, fruits secs, viande, épices) dans l'exposition de l'homme à l'OTA a été étudiée à partir des résultats obtenus de 13 états membres. Les céréales constituent la source principale de la consommation d'OTA (50%). Le vin et le café constituent une source non négligeable d'apport d'OTA avec 13 et 10 % respectivement. Elle est retrouvée dans les épices (8%), la bière (5%), cacao (4%), fruits secs (3%) et la viande (1%) (D'après SCOOP Task 3.2.7, European 2002b).

En France, le conseil supérieur d'hygiène publique (CSHPF) a réalisé en 1999, à partir d'analyses faites par l'observatoire des consommations alimentaires, une évaluation de la part respective de huit produits alimentaires (riz, blé, maïs, abats de porc, foie de volaille, charcuterie, viande de porc, boudin noir) dans la consommation moyenne de l'OTA par l'ensemble de la population française. Le blé constitue la source principale de contamination par l'OTA (73%), suivi par le maïs (21%). Dans la charcuterie, le riz et la viande de porc, elle représente respectivement 3%, 2% et 1% de la consommation moyenne d'OTA (en ng/jour x kg poids corporel) dans l'ensemble de la population (d'après Verger, 1999).

## 2.3 Toxicocinétique

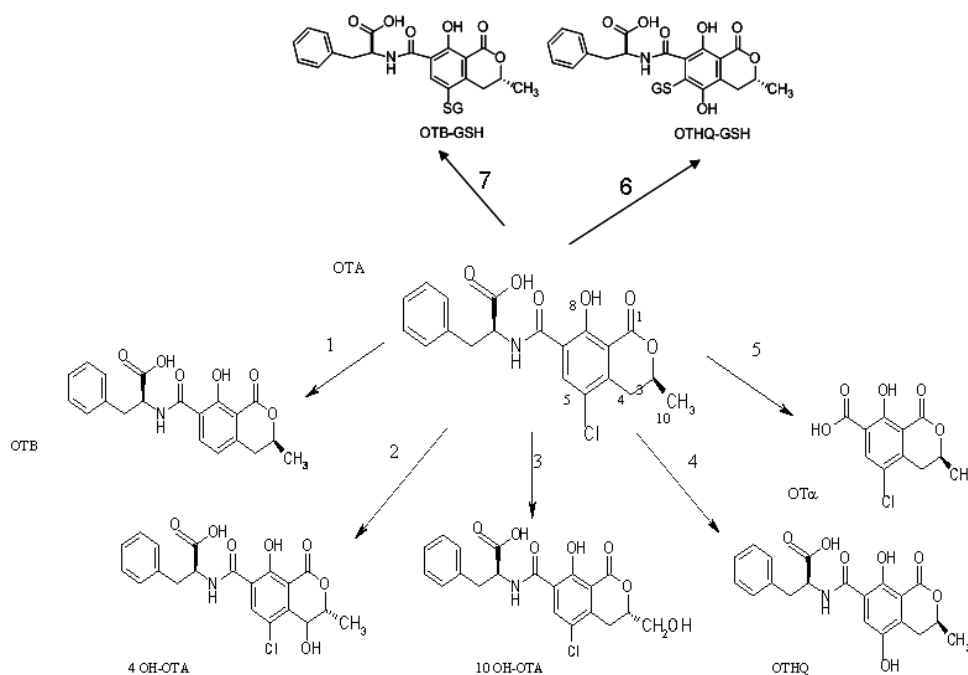
Une fois ingérée, l'OTA est partiellement absorbée par la diffusion passive de la forme non ionisée à travers la paroi de l'estomac. Néanmoins, le site principal d'absorption se situe au niveau de l'intestin partiellement par diffusion passive mais surtout *via* des transporteurs (pour une revue voir Ringot *et al.*, 2006 ; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). L'OTA a une très grande affinité pour certaines protéines plasmatiques (albumine), elle est fixée à 90 % sur deux sites (sous-unités IIA et IIB de l'albumine sérique) (Hagelberg *et al.*, 1989 ; Il'ichev *et al.*, 2002 ; Dai *et al.*, 2004). Cette fixation retarde donc le transport de l'OTA vers les différents organes et augmente sa demi-vie et par conséquent contribuerait au développement des effets toxiques chroniques de cette toxine.

L'OTA est éliminée par toutes les voies d'excrétion (urinaire, biliaire et le lait). Une partie de l'OTA qui se retrouve dans la bile peut être réabsorbée au niveau de l'intestin (cycle entéro-hépatique). Trente à quarante pourcents sont éliminés par voie urinaire (Støren *et al.*, 1982). Une partie de l'OTA, excrétée dans l'urine, est réabsorbée au niveau des tubules rénaux ce qui conduit à son accumulation dans les cellules rénales et éventuellement à son retour dans la circulation sanguine. Tous ces phénomènes expliquent sa longue persistance dans l'organisme. La demi-vie calculée chez l'Humain est de 35 jours (Schlatter *et al.*, 1996 ; Studer-Rohr, 2000). Des études récentes ont montré qu'il y avait une différence dans la toxicocinétique chez le rat en fonction du sexe de l'animal, de sa maturité et le fait que l'exposition à l'OTA survienne après une période de jeûne (Vettorazzi *et al.*, 2009 ; 2010 ; 2011).

Sur la figure 2 est schématisée la métabolisation de l'OTA. L'étude de la relation entre génotoxicité et métabolisation de l'OTA a fait l'objet de plusieurs thèses au laboratoire (Grosse, 1997; Azémar, 2000 ; Faucet-Marquis, 2005 ; Canadas, 2006 ; Tozlovanu, 2008)

L'OTA est métabolisée en une vingtaine de métabolites (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007; Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2008). Les plus connus sont trois composés hydroxylés [4 (S) OH-OTA; 4 (R) OH-OTA; 10 OH-OTA] générés par l'action de cytochromes P450 et l'OT $\alpha$  généré quant à lui, par l'action de la carboxypeptidase (figure 2).

Les peroxydases telles que les cyclooxygénases, lipooxygénases et glutathion peroxydases interviennent dans la métabolisation de l'OTA. Les peroxydases sont notamment impliquées dans la formation dans l'organisme de l'ochratoxine B (OTB) analogue déchloré de l'OTA (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007 ; Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2008). Les métabolites hydroxylés et l'OT $\alpha$  sont moins toxiques que l'OTA (Faucet, 2005 ; Faucet *et al.*, 2006). Les études de corrélation « structure-activité » ont montré que, le groupement carboxylique de la phénylalanine, l'atome de chlore en C5 et l'hydroxyle en C8 (Malaveille *et al.*, 1991 ; 1994) favorisent la toxicité de l'OTA.



1 : Peroxydases / 2 et 3 : Cytochrome P 450 / 4 : Cytochrome P 450 et Peroxydases/ 5 : Carboxypeptidases A / 6 : Cytochrome P450 et Peroxydases et conjugaison / 7 : Peroxydases et conjugaison

Figure 2: Métabolisation de l'OTA (adapté de Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2006 ; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2012)

Le dérivé benzoquinone (OTQ) (figure 3) formé par déchloration oxydative de la partie parachlorophénol de l'OTA est corrélée à l'activité génotoxique de l'OTA. Par analogie à la métabolisation du pentachlorophénol, l'OTQ peut conduire à l'adduit à l'ADN, appelé benzetheno dG-OTA (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007 ; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2012).

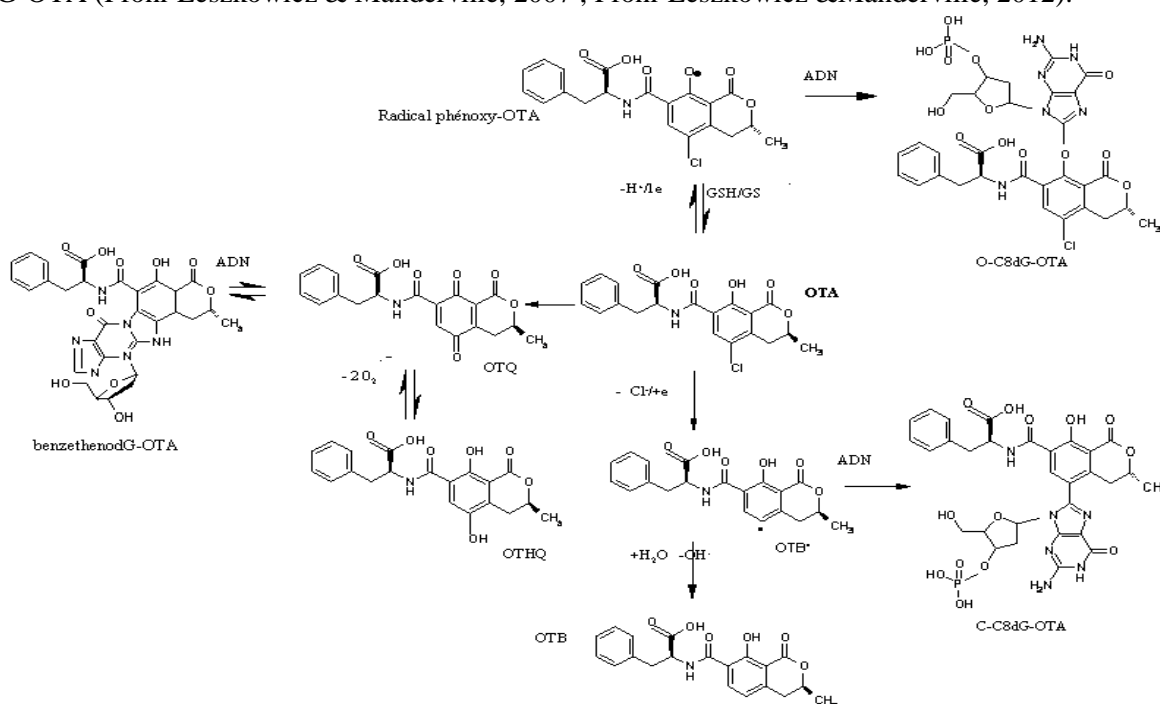


Figure 3 : Voies connues de métabolisation de l'OTA conduisant aux adduits sur la guanine (d'après Pfohl-leszkowicz & Manderville, 2012)

Comme le montre la figure 4, le cycle d'oxydoréduction des formes quinones de l'OTA (OTQ/OTHQ) passe par la génération des deux espèces radicalaires, le radical phénoxy-OTA semiquinone et l'anion superoxyde, impliqués dans le stress oxydant observé lors d'intoxication par l'OTA (Pfohl-Leschkowicz & Manderville, 2007). Le radical hydroxyle est également formé lors de la déhalogénéation réductive de l'OTA en OTB, en passant par un intermédiaire radicalaire carbone centré (OTB.) (figure 4). L'OTB réagit ensuite avec la guanine de l'ADN, pour donner un deuxième adduit à l'ADN, le C-C8 dG OTA. Ce dernier a récemment été identifié *in vivo* dans des échantillons par HPLC/MS/MS (Pfohl-Leschkowicz *et al.*, 2009 ; Mantle *et al.*, 2010). Le radical phénoxy-OTA (figure 4) conduit à un troisième adduit à l'ADN (O-C8dG OTA), qui a été observé dans le rein de rat (Faucet *et al.*, 2004). Ce phénoxyradical peut régénérer de l'OTA avec production simultanée d'anion superoxyde, lors de la formation de GSSG à partir du radical GS<sup>•</sup>. Le stress oxydant observé suite à une exposition à l'OTA, est clairement la conséquence de la métabolisation de l'OTA en différents dérivés radicalaires (Manderville & Pfohl-Leschkowicz, 2008; Pfohl-Leschkowicz & Manderville, 2012). Ces dérivés issus du cycle redox des formes quinones de l'OTA et/ou la mise en évidence du stress oxydant engendré par cette métabolisation constituent une voie d'identification de biomarqueur d'effet précoce.

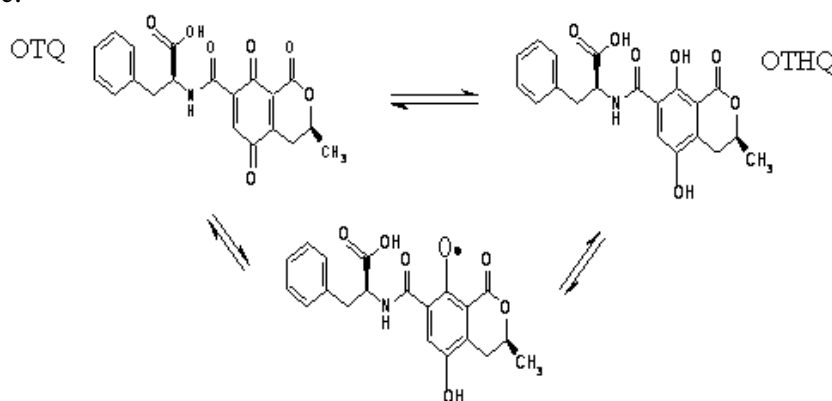


Figure 4 : Cycle d'oxydoréduction des formes quinones de l'OTA

Les métabolites (OTHQ, OTB, OTQ), ont été détectés, isolés et identifiés par MS/MS à partir de fluides biologiques (sang ; urines ; lait) d'animaux ou d'individus exposés à l'OTA (Manderville & Pfohl-Leschkowicz, 2008 ; Pfohl-Leschkowicz & Manderville, 2007; Pfohl-Leschkowicz, 2009). Ces métabolites sont particulièrement intéressants car ils sont corrélés à la formation des adduits à l'ADN. Comme les métabolites, les adduits à l'ADN et le stress oxydant apparaissent avant les manifestations cliniques dues à la mycotoxine ; ainsi leur détection peut de ce fait constituer un diagnostic précoce (Pfohl-Leschkowicz, 2008; Pfohl-Leschkowicz, 2009).

## 2.4 Effets toxiques

Les effets toxiques sont en fait la résultante de liaisons covalentes d'un ou de plusieurs métabolites de l'OTA sur la molécule d'ADN et d'un stress oxydatif lors de la métabolisation (Manderville & Pfohl-Leschkowicz, 2008 ; Pfohl-Leschkowicz *et al.*, 2002).

### 2.4.1 Néphrotoxicité

L'OTA est potentiellement néphrotoxique chez toutes les espèces testées à l'exception de ruminants adultes. L'OTA semble jouer un rôle majeur dans l'étiologie de la néphropathie porcine, même si la citrinine est peut-être également impliquée (Krogh *et al.*, 1974).

Dès 1972, Krogh (Krogh *et al.*, 1972) a montré des similitudes entre la néphropathie porcine et la Néphropathie Endémique des Balkans (BEN) et propose l'OTA comme l'un des agents qui pourrait jouer un rôle dans l'étiologie de cette maladie. La BEN est une néphropathie caractérisée par une tubulonéphrite interstitielle avec enzymurie. L'évolution de la pathologie est lente et souvent

asymptomatique. A long terme, elle conduit à une atrophie rénale sévère voire à des tumeurs du tractus urinaire chez l'homme (Chernozemsky *et al.*, 1977, Markovic *et al.*, 1985).

Des études épidémiologiques mettent en avant le lien entre la présence d'OTA dans la nourriture et l'incidence de la BEN (Petkova-Bocharova *et al.*, 1988 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002) (Pour une revue voir Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

L'OTA est en synergie avec d'autres mycotoxines, le principal agent causal de la néphropathie endémique des Balkans et à l'origine, de l'incidence élevée de tumeurs du tractus urinaire (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002a ; Pfohl-Leszkowicz & Manderville 2007 ; Pfohl-Leszkowicz, 2009). Ces néphropathies ne sont pas limitées aux Balkans. Dans d'autres parties du monde (Afrique, Asie, Canada), les effets toxiques dus à l'OTA sont aussi très élevés (Kuiper-Goodman *et al.*, 2010). Les premiers signes cliniques de la BEN apparaissent sans qu'il y ait eu un épisode d'effet toxique aigu, et consiste en une anémie (aplasique ou normochrome) et une très légère protéinurie sans hypertension ni œdème. Le taux d'urée et de créatinine augmente lentement et régulièrement conduisant à une hypertension en phase finale. Les premiers signes histopathologiques sont des phénomènes de dégénérescence, régénération des cellules épithéliales des tubules proximaux du rein sans diminution de la taille du rein. Dans la partie interstitielle du cortex s'accumule des éosinophiles ainsi que du matériel acellulaire. Il n'y a pas d'inflammation ni de lésion glomérulaire. La maladie évolue lentement jusqu'à l'atrophie du rein, une fibrose corticale diffuse sans inflammation. Le tubule proximal se nécrose, il y a fibrose corticale et hyalinisation glomérulaire. Dans la région des Balkans où sévit cette maladie, une incidence très élevée de tumeurs du tractus urinaires est observée. Ces tumeurs sont fréquentes dans le tractus urinaire supérieur (pelvis rénal et uretères) (Stefanovic *et al.*, 2006). Les femmes sont plus souvent atteintes de néphrotoxicité, ce sont par contre les hommes qui meurent le plus de cancers rénaux. Dans les régions endémiques des Balkans plusieurs études de contaminations des aliments (blé, maïs, orge, haricots, pomme de terre, fibres) et des nourritures ont été réalisées. Le taux d'OTA est relativement élevé et dans certaines études une plus forte incidence et un taux plus élevé d'OTA sont observés dans les régions endémiques par rapport à la région non endémique. Plusieurs études ont consisté à suivre le taux d'OTA ingéré quotidiennement, le taux d'OTA dans le sang et le taux d'OTA excrété dans l'urine. Même si généralement les taux sont plus élevés dans les familles où sévit la BEN, la corrélation entre les trois mesures n'est pas parfaite. L'explication a été donnée par les études chez l'animal montrant que la forte fixation de l'OTA sur les protéines et dans les tissus modulait la distribution et l'élimination (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007; Castegnaro *et al.*, 2006b). Les familles affectées par la BEN et les tumeurs associées sont des personnes vivant à la campagne et consommant pour la plupart leur propre production. Les conditions de stockage en milieu humide est propice au développement des moisissures et production de la toxine. Les animaux (porc et volailles) dans leur ferme présentent les mêmes symptômes. Quelques études faites en Afrique (Tunisie, Egypte) laissent penser que certaines néphropathies seraient dues à une contamination en OTA.

#### 2.4.2 Cancérogénicité

Dès 1971 l'hypothèse de la cancérogénicité de l'OTA a été émise. Dans un groupe de 10 rats Wistar ayant reçu chacun une dose de 300 µg/kg d'OTA, 5 jours par semaine pendant 50 semaines, un animal avait développé un cancer rénal (Purchase *et al.*, 1971).

Chez des souris ayant reçu une nourriture contaminée par de l'OTA, Kanisawa et Suzuki (1975) ont observé non seulement l'apparition de tumeurs rénales, mais également des tumeurs hépatiques. Dans deux groupes de souris B6C3F1 (49 mâles et 49 femelles) ayant été nourris, avec de l'OTA, il a été observé des différences d'effets entre mâles et femelles. Les mâles développant de carcinomes et adénomes rénaux. Peu de femelles souffraient de néphropathies et aucune n'avait développé de carcinome ou d'adénome rénal. Cependant, une augmentation du nombre de néoplasmes hépatocellulaires a été observée chez les mâles et les femelles traités.

L'étude du programme national de toxicologie américain (NTP) sur des rats F344/N mâles et femelles, a permis de confirmer le pouvoir cancérogène de l'OTA. Trois doses d'OTA ont été administrées à ces rats par voie orale, 210, 70 et 21 µg d'OTA par kg de poids corporel quotidiennement pendant deux ans. A la forte dose d'OTA, 72 % des mâles et 16 % des femelles ont développé des néoplasmes. A la dose de 70µg d'OTA, l'incidence des néoplasmes est de 39 % pour

les mâles et 4 % pour les femelles. A ces 2 doses, l'OTA provoque également des modifications rénales non néoplasiques, comme des hyperplasies, des proliférations cellulaires, des altérations cytoplasmiques, des karyomégalias au niveau des cellules tubulaires et des dégénérescences de l'épithélium tubulaire.

Une étude effectuée par le Centre Internationale de Recherche sur le Cancer (CIRC), sur deux espèces de rats (Lewis et Dark Agouty), a montré une susceptibilité plus importante des rats mâles par rapport aux femelles. La différence est beaucoup plus flagrante dans l'espèce Dark Agouty où les mâles développent des tumeurs alors que les femelles sont complètement épargnées (Castegnaro *et al.*, 1998 b). Des études concernant le patrimoine génétique des rats a permis de mettre en évidence que la différence de susceptibilité était essentiellement liée au CYP 2C, qui est de nature différente chez le mâle et la femelle (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 1998). Comme le 2-mercaptoethane sulfonate (MESNA) protège les rats contre la néphrotoxicité et la carcinogénicité induite par un stress oxydatif du à une augmentation de groupement thiol libre, l'effet protecteur du MESNA sur la carcinogénicité de l'OTA a été étudié dans une étude à long terme (Pfohl-Leskowicz, *et al.*, 2002). Dans cette étude, il a été montré que le MESNA permet de diminuer significativement les caryomégalias dans le rein de tous les animaux traités, mais n'a par contre aucun effet bénéfique pour diminuer l'incidence des carcinomes rénaux. Ce résultat indique que les mécanismes de néphrotoxicité sont différents de ceux mis en jeu dans le processus de carcinogénicité. Une augmentation significative des tumeurs rénales est observée chez les rats male Dark Agouty. Les tumeurs de la vessie quant à elle ont disparu lors du traitement par le MESNA laissant supposer qu'elle dépend d'un stress oxydatif.

Dans une étude récente de carcinogénicité chez des rats Fischer F344 (Mantle *et al.*, 2005), de l'OTA à raison 100 µg/jour a été administrée *via* l'alimentation. Aucune tumeur n'a été observée chez les témoins. Chez les rats ayant ingérés de l'OTA, les premières tumeurs ont été découvertes après 75 semaines. Vingt % des rats avaient des carcinomes rénaux et du parenchyme rénal. Il y avait des métastases au niveau du mésentère abdominal, parfois aussi au niveau des poumons (Mantle *et al.*, 2005). Les glandes mammaires sont vraisemblablement aussi une cible potentielle. En effet une augmentation statistique de l'incidence de fibroadénome des glandes mammaires a été observée chez les femelles traitées par la plus forte dose d'OTA comparée aux témoins (17/50). L'incidence de fibroadénomes multiple est encore plus significative (14/50 animaux traités *versus* 4/50 témoins). Aucune tumeur des glandes mammaires chez le rat mâle n'a été observée (Son *et al.*, 2003).

En 2002, l'équipe de Schwartz a émis l'hypothèse de l'implication de l'OTA également dans les cancers testiculaires (Schwartz, 2001 ; Jennings-Gee *et al.*, 2010). La dégénérescence testiculaire a été confirmée récemment chez les rongeurs (Malekinejad *et al.*, 2011).

Lors de la dernière évaluation réalisée par le CIRC (IARC 1993), l'OTA a été classée dans le groupe 2B : « cancérigène possible pour l'homme ».

### 2.4.3 Génotoxicité et mutagénicité

L'OTA a été longtemps considérée comme non génotoxique. Néanmoins, une activité mutagène par test d'Ames a été mise en évidence par l'équipe de Hennig (1991) après métabolisation de l'OTA par des hépatocytes de rat. Ces auteurs ont également constaté une induction d'échanges de chromatides sœurs dans des lymphocytes humains cultivés dans un milieu contenant de l'OTA métabolisée par ces mêmes hépatocytes.

De même, une activité mutagénique a aussi été observée chez les souches TA 1535 , 1538 et 98 exposées à de l'OTA préalablement métabolisée par des fractions microsomales de rein de souris en présence de cofacteurs, NADP ou d'acide arachidonique (Obrecht-Pflumio *et al.*, 1999).

La génotoxicité de l'OTA a été démontrée en utilisant d'autres types de cellules de mammifères. Une désorganisation de la synthèse d'ADN a été observée dans des hépatocytes de rats ACI et de souris C3H en culture (Mori *et al.*, 1984). Une augmentation faible, mais significative et dépendante de la dose, des échanges entre chromatides sœurs a aussi été démontrée après traitement de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) par l'OTA (Boorman, 1989).

Manolova *et al.* (1990) ont montré la présence d'aberrations chromosomiques sur le chromosome X de lymphocytes humains cultivés en présence de 15 nM d'OTA. Ce type d'aberration se retrouve chez les patients souffrant de BEN. Des cassures simple brin ont été observées au niveau

de l'ADN de rein, de foie et de souris Balb/c ainsi qu'au niveau de l'ADN de rein et de foie de rats (Kane *et al.*, 1986 a). Ces dommages à l'ADN apparaissent 24 heures après administration de l'OTA.

Lebrun et Föllmann (2002) ont montré que l'OTA induisait, de manière dose-dépendante, des cassures simple brin de l'ADN de cellules de rein de chien (MDCK). Cet effet est accru lorsque la toxine est incubée en présence de microsomes de foie de rat. Cet effet a été confirmé par des études de cassure de l'ADN (Simarro *et al.*, 2005). L'OTA induit aussi des micronoyaux (Obrecht-Pflumio *et al.*, 2000 ; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007 et 2012).

L'OTA est cancérigène par un mécanisme de génotoxicité directe par formation d'adduit covalent au niveau du carbone 8 de la guanine (Faucet, *et al.*, 2004 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2009; Mantle *et al.*, 2010 ; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2012). Grâce à la technique de détection des adduits au phosphore 32, la relation entre métabolisme et génotoxicité a pu être mise en évidence au niveau des reins et autres organes de plusieurs animaux traités par l'OTA (pour des articles de synthèses voir Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2005 ; Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2006 ; 2008; Pfohl-Leszkowicz & Manderville 2007; 2012) et par HPLC-MS/MS (Mantle *et al.*, 2010). L'OTA induit de manière dose et temps dépendant la formation de plusieurs d'adduits. Ces adduits covalents proviennent de la biotransformation de l'OTA par les CYP 1A2, CYP 2C9 et 3A4 (Grosse *et al.*, 1995 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1998 ; El Adlouni *et al.*, 2000) ainsi que des cyclooxygénases (COX) et la lipoxygénase (LOX) (Pinelli *et al.*, 1999a; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007; Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2008). La susceptibilité des individus à l'OTA serait due au polymorphisme génétique du CYP 2C, de la glutathion-S-transférase M1 ainsi qu'au CYP 3A4. En effet la stimulation ou l'inhibition de ces différents enzymes modulent parallèlement les adduits et la carcinogénicité chez l'animal (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1998; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002). Une voie importante de métabolisation de l'OTA est sa transformation en dérivé quinone (OTHQ) (Tozlovanu *et al.*, 2006a; thèse Tozlovanu, 2008 ; Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2008 ; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2012).

La susceptibilité des animaux vis-à-vis du développement de tumeurs rénales dépend du patrimoine génétique et du sexe des animaux. Il y a une corrélation entre les adduits à l'ADN au niveau du rein et les tumeurs rénales. Des adduits sont formés principalement sur la guanine mais aussi sur l'adénine (Azemar, 2000; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2005a). La prévalence de la formation d'adduit sur la guanine a aussi été décrite par Obrecht & Dirheimer (Obrecht-Pflumio & Dirheimer, 2001; 2002).

#### **2.4.4 Tératogénicité**

L'OTA est tératogène chez l'animal. Elle provoque des anomalies morphologiques diverses chez le rat, la souris, le hamster, le porc et les embryons de poulet (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

L'administration d'OTA, à des ratte gestantes occasionne une perte de poids des fœtus ainsi qu'une proportion anormale de fœtus présentant des hémorragies. L'OTA passe dans le placenta, s'accumule et altère un certain nombre de paramètres associés à la croissance et à la différenciation cellulaire embryonnaire chez le rat, en fonction de la dose et chez la souris ; ce qui démontre l'action directe de cette toxine sur le développement embryonnaire (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

### **2.5 Effet de l'OTA sur les animaux**

#### **2.5.1 Porcins**

Les porcs sont très sensibles à l'ochratoxine A (OTA). A forte dose, elle conduit à une néphrotoxicité (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). A faible dose (25-50 µg/kg pc) l'OTA peut provoquer une polydypsie et une polyurie, symptômes qui sont durables (Krogh *et al.*, 1979 ; Stoev *et al.*, 2000). Ceci est dû à une altération de la fonction tubulaire avec fuite des électrolytes comme le sodium, le potassium, les ions H<sup>+</sup> (acidification des urines). Les porcs (10-12kg) exposés à des aliments contenant 0,13 à 0,79 ppm d'OTA pendant 3 mois consomment moins d'aliments et ont une vitesse de croissance réduite (Stoev *et al.*, 2002).

L'OTA affecte aussi la fonction immunitaire des porcs. Les porcs sont plus sensibles aux infections. Les porcs ingérant une nourriture moisie par *A.ochraceus* et contenant environ 1ppm

d'OTA sont beaucoup plus sensibles à *Salmonella choleraesuis*, qui est d'ailleurs retrouvée dans les fèces et le foie des animaux. Les porcs immunisés contre *S. choleraesuis* et ingérant des aliments contenant 1ppm OTA, ont des diarrhées sanglantes (Stoev *et al.*, 2000). De même, des porcs exposés à des doses sub-toxiques d'OTA (5-50µg/kg pc pendant 28 jours) développent une pneumonie plus sévère (Skaug *et al.*, 2001).

L'OTA pourrait altérer la reproduction des porcs puisque de l'OTA est retrouvée dans le liquide séminale de verrats consommant 20-40µg/j (Solti *et al.*, 1999; Biro *et al.*, 2002), la viabilité des spermatozoïdes, leur motilité et leur longévité est significativement réduite après un délai lié à la durée du cycle de spermatogénèse (39 j chez le porc) (Ewald & Heer, 1989).

L'OTA s'accumule dans le rein. L'élimination est très lente puisque 6 semaines après le retrait de l'aliment contaminé, on retrouve encore de l'OTA (Biro *et al.*, 2002). On retrouve de l'OTA dans les produits carnés à base de porc à des taux allant de 0,11 à 0,3 µg/kg (Gareis & Scheuer, 2000). La charcuterie produite à partir de porcs ayant consommé un aliment contenant 0,09 ppm pendant les 4 dernières semaines de leur vie en contient, en moyenne 12,5 µg/kg (Lusky *et al.*, 1995).

Des études écologiques ont révélé que l'OTA est un des facteurs majeurs de la néphropathie porcine, bien que d'autres agents comme la citrinine puissent également être mis en cause (Stoev *et al.*, 2002a).

### 2.5.2 Volailles

Les dindons, poulets et canards sont sensibles à l'OTA. Les signes pathologiques sont réduction du gain de poids, mauvaise conversion alimentaire, production réduite d'œufs, qualité médiocre des œufs et néphrotoxicité (Stoev *et al.*, 2004). L'exposition à des aliments contaminés à raison de 1-5 mg/kg provoque des perturbations biochimiques au niveau sanguin : baisse du taux de cholestérol, de protéine totale, d'albumine, potassium et triglycérides et une augmentation d'acide urique et de créatine ainsi que des activités phosphatase alcaline (ALP) et gamma glutamyltranspeptidase (γGT) (Denli *et al.*, 2008 ; e *et al.*, 1999). Les effets dépendent du taux de toxine et du temps d'exposition. Cependant plusieurs études montrent que même à des concentrations relativement basses (0,5ppm), les performances sont altérées (Prior *et al.*, 1980 ; Wang *et al.*, 2009). A des concentrations deux fois plus faibles (0,25ppm), une baisse des défenses immunitaires est observée chez les poulets (Wang *et al.*, 2009). En effet les poulets exposés à l'OTA, sont plus sensibles aux infections bactériennes ou aux parasites (Koynarski *et al.*, 2007 ; Stoev *et al.*, 2002b) car l'OTA déprime l'immunité humorale et la formation des anticorps (Dwivedi et Burns, 1984; Stoev *et al.*, 2000).

De l'OTA est retrouvée dans la chair des volailles et dans les œufs (Piskorska-Pliszczyńska et Juszkiewicz, 1990). La baisse de la production d'œuf est observée chez la poule pondeuse (Haazele, *et al.*, 1993 ; Verma *et al.*, 2003). Dans une étude récente, il a été montré que l'exposition pendant 30 j à un aliment contaminé à raison de 100µg/kg conduisait à une baisse du poids des œufs. Cette baisse est d'autant plus importante que le taux d'OTA est élevé. La baisse survient dès le 3<sup>ème</sup> jour d'exposition. D'autre part les coquilles sont plus fragiles, il y a également des pigmentations sanguines dans le jaune d'œuf. Des anomalies discrètes au niveau rénal sont observées, mais également au niveau du foie (Bozzo *et al.*, 2009 ; et 2011). De l'OTA est retrouvée dans le rein (0,24µg/kg), le foie (0,2 µg/kg) et la chair (0,1 µg/kg) des poulets exposés à 100 ppb d'OTA. Les quantités retrouvées augmentent avec l'exposition (Bozzo *et al.*, 2011). Aucun résidu d'OTA n'a été retrouvé dans les œufs, mais ce résultat n'est pas étonnant puisque l'analyse a été réalisée après extraction en milieu alcalin et passage sur colonne d'immunoaffinité. Cette technique ne permet pas de récupérer correctement l'OTA qui est convertie en OP-OTA non reconnue par les colonnes d'immunoaffinité (Castegnaro *et al.*, 2006a). En considérant une consommation de 300g de poulet contenant 1,07 µg/kg (valeur maximale retrouvée lors d'une exposition à 100 ppb) un consommateur de 60kg est exposé à 5ng/kg pc/j (35µg/kg/semaine), valeur qui correspond à la dose virtuellement sûre pour éviter les cancers (Kuiper-Goodman *et al.*, 2010). Il est à noter qu'il est fréquent de trouver un aliment contaminé à des taux allant de 165-330µg/kg (Bozzo *et al.*, 2008).

Récemment, il a été montré que l'OTA provoquait des cancers du foie et des reins chez les poulets ainsi qu'une déplétion du système lymphoïdes, des œdèmes et une dégénérescence du cerveau (Stoev, 2010).

L'effet de l'OTA sur le canard (50-250µg/kg aliment) a été étudié pendant six semaines, le taux de globules blancs baisse et le taux d'acide urique est modifié comme le montrent les dommages rénaux (Tansakul *et al.*, 2011).

Lorsque les poulets sont exposés simultanément à l'OTA et à l'acide pénicillique (PA), un taux de 100 ppb d'OTA est suffisant pour qu'apparaisse des effets toxiques sévères, tels que la chute des cellules lymphoïdes, diminution du poids des organes, changement des paramètres biochimiques (Micco *et al.*, 1991b). De plus, la dégénérescence et la diminution du poids des reins, du foie et les organes lymphoïdes ainsi que l'immunosuppression est observé chez les poulets exposés à 200ppb d'OTA et d'acide pénicillique (PA) (Stoev, 1998) alors que de telles modifications ne sont observés qu'avec 4ppm d'OTA pure dans l'aliment (Manning & Wyatt, 1984 ; Koynarski *et al.*, 2007).

### 2.5.3 Bovins

L'exposition des bovins à l'ochratoxine A pose surtout le problème de la concentration de cette toxine dans le lait. Certains échantillons de lait contiennent jusqu'à 2,75µg/L alors que la nourriture était contaminée à des taux allant de 0,6 à 1,6µg/kg (Elzupir *et al.*, 2009).

La production de lait diminue lorsque les vaches ingèrent une nourriture contaminée par de l'OTA (7396 kg/an au lieu de 7982 kg/an) (Boudra *et al.*, 2007). Une ingestion d'une dose unique de 13,3mg/kg pc entraîne la cessation immédiate de la production de lait, qui ne revient pas à la normale après cessation de l'exposition (baisse de 60%) (Richard *et al.*, 1999). L'ingestion par les vaches laitières de ration contenant naturellement 380µg OTA/kg conduit à des diarrhées, dépression, prostrations (Abramson *et al.*, 1983). On retrouve aussi dans le lait des métabolites de l'OTA, notamment de l'OTα du à l'action du rumen. Récemment nous avons trouvé de l'OP-OTA (forme ouverte de l'OTA), mais dont la toxicité est équivalente à celle de l'OTA (Faucet-Marquis *et al.*, 2005).

### 2.5.4 Animaux de compagnie (chat et chien)

Une exposition pendant deux semaines à 0,3 mg de l'ochratoxine A /kg de poids corporel, est mortelle pour les jeunes chiens beagle mâle, qui présentent de graves lésions rénales, de l'anorexie, vomissements, perte de poids, ténesme (une tension douloureuse, au niveau de l'anus ou de la vessie, avec sensation de brûlure), hémorragie intestinale, amygdalite, déshydratation et prostration (Szczech *et al.*, 1973). Ces constatations ont été confirmées par une étude ultérieure dans laquelle les chiens ont montré des symptômes similaires à des doses OTA entre 0,2 et 3mg/kg de poids corporel (Kitchen *et al.*, 1977).

Bien que la présence d'ochratoxine A soit largement constatée dans les aliments pour animaux domestiques et qu'elle ait une longue demi-vie *in vivo*, l'importance de son effet sur la santé des animaux de compagnie n'est pas très clair.

Plusieurs études en Europe ont montré que la plupart des aliments pour animaux de compagnie ont des teneurs inférieures à celles pouvant être détectables ou contiennent des taux inférieurs à 5µg/kg. L'effet chronique d'une faible exposition alimentaire n'a pas été étudié chez les animaux de compagnie.

## 3. La zéaralénone (ZEA)

### 3.1 Origine et structure de la ZEA

La ZEA a été isolée pour la première fois en 1962 et sa structure a été élucidée en 1966 (figure 5). La ZEA est une lactone macrocyclique de formule brute C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>, et sa dénomination scientifique est 5S, 11E-3, 4, 5, 6, 10-hexahydro-14,16dihydroxy-3-méthyl-1H-2 benzoxacyclotetradecin-1,7(8H)-dione. Ses principaux métabolites (figure 5) sont :

- α-zéaralénone et β-zéaralénone qui sont hydroxylés en position 6 'de la ZEA
- α-zéaralanol et β-zéaralanol qui sont saturés en position 1'2' zéaralénol



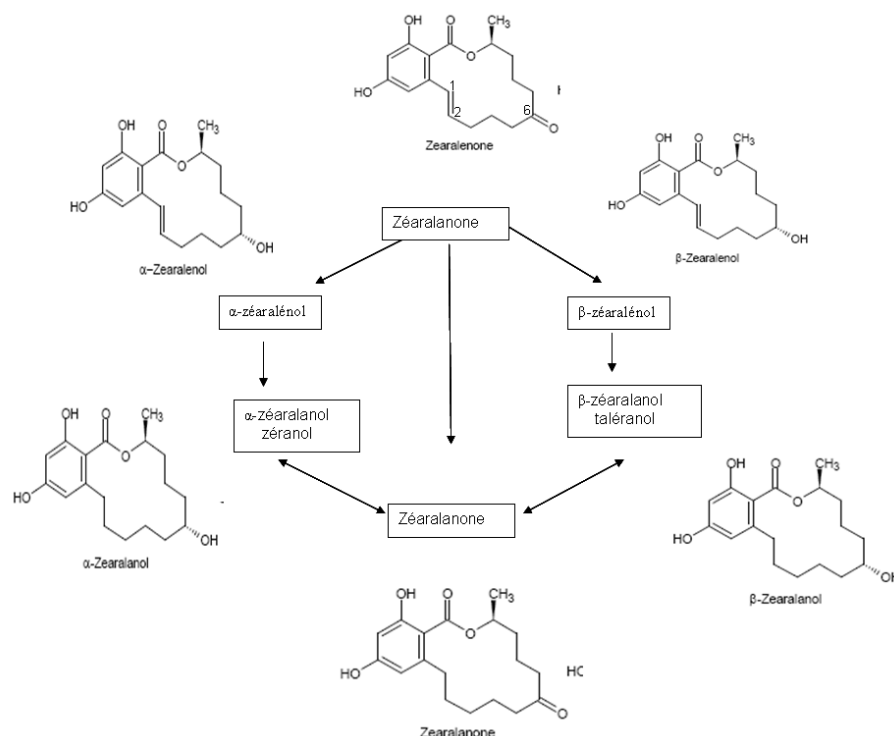


Figure 5: Métabolisation de la zéaralénone

La ZEA est un produit stable même à forte température et peut donc facilement se retrouver dans l'organisme animal ou humain. De nombreux animaux sont sensibles à cette mycotoxine (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

C'est aussi un intermédiaire dans la fabrication du zéranol, substance utilisée comme anabolisant aux USA. Le zéaralanol est commercialisé comme agent de croissance pour les ovins et les bovins sous le nom de RalgrOND.

### 3.2 Exposition de l'homme

La zéaralénone est produite par des *Fusaria*, en particulier *F.graminearum*, *F.semitectum*, *F.equiseti*, *F.crookwellense* et *F.culmorum*, plus rarement par *F.tricinctum*, *F.moliniforme*, *F.oxysporum*, *F.sporotrichoides* et *Flaterium* (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Elles peuvent se retrouver dans les céréales notamment lorsque celles-ci ont été stockées dans de mauvaises conditions, à des températures relativement basses et exposées à l'humidité.

La zéaralénone a été retrouvée dans de nombreuses céréales comme le maïs, les flocons d'avoine, le riz, le blé et le sorgho, dans le pain, et ce dans le monde entier : Afrique, Asie, Europe, Etats-Unis, Amérique du sud, et en Océanie (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Récemment, il a été mis en évidence la présence de ZEA et de ses métabolites dans des laits infantiles pointant un risque particulier chez les enfants en bas âge (Meucci *et al.*, 2011).

### 3.3 Toxicocinétique

La ZEA est rapidement absorbée par voie orale. Après diffusion au niveau l'intestin grêle, elle est distribuée aux différents organes *via* la circulation sanguine (Biehl *et al.*, 1993). Comme les hormones sexuelles endogènes, elle s'associe à la SBP (*Steroid Binding Protein*). La demi-vie plasmatique de la ZEA est relativement importante (86 h chez le porc après administration de ZEA en injection intraveineuse). Ceci est dû à la redistribution *via* le cycle entéro-hépatique et à la persistance dans les tissus adipeux.

Les tissus cibles de cette mycotoxine chez les souris: l'utérus, les cellules interstitielles des testicules et les follicules ovariens. Chez d'autres animaux, on en retrouve dans les œufs de poules, le lait de vache, de mouton et de porc ou dans le foie de porc (Pfohl-Leskowicz, 1999).

Il existe deux voies de métabolisation de la ZEA (Zinedine *et al.*, 2007) : l'hydroxylation catalysée par 3 $\alpha$  ou 3 $\beta$  Hydroxystéroïde déshydrogénase (HSDs), et la glucuronoconjugaison de la ZEA et de ses métabolites formés par HSDs.

L'excrétion biliaire de cette mycotoxine et de ses métabolites est une voie d'élimination importante chez le rat, le chien, le singe (Migdalof *et al.*, 1983) et également chez le porc (Biehl *et al.*, 1993). Le cycle entéro-hépatique chez la truie entraîne une augmentation conséquente de la demi-vie, ce qui pourrait expliquer la grande sensibilité de cette espèce à cette mycotoxine. Chez le porc, après avoir suivi le cycle entéro-hépatique, la quasi-totalité est excrétée dans les urines sous forme d' $\alpha$ -zéaralénol et de ZEA.

Chez les ovins, la ZEA est éliminée sous forme inchangée dans les urines ainsi que sous forme de zéaranol,  $\alpha$ -zéaralénol,  $\beta$ -zéaralénol et taléranol (Pfohl-Leskowicz, 1999). Malgré des études limitées chez l'homme, on suppose que l'excrétion est majoritairement urinaire (OSCF 2000). Il a été démontré que l'excrétion biliaire est réduite chez l'homme comparée à d'autres espèces comme le rat, le chien et le singe (Migdalof *et al.*, 1983). La ZEA se retrouve dans le lait de truie, 42 à 44 heures après la consommation d'aliment contaminé par 40 ppm de zéaralénone, et jusqu'à 5 jours après son retrait (Gaumy, 2001).

Chez la vache allaitante, un passage de ZEA et de ses métabolites, en plus faible quantité que pour la truie, a été observée. Elle est retrouvée sous formes libres ou conjuguées (glucurono et sulfoconjugués) (Mirocha *et al.*, 1981).

### 3.4 Effets toxiques

#### 3.4.1 Fixation aux récepteurs œstrogéniques dans les tissus cibles

La zéaralénone et ses dérivés sont capables d'adopter une conformation qui ressemble au 17 $\beta$ -œstradiol, ainsi qu'aux autres œstrogènes naturels, pour permettre leur liaison aux récepteurs œstrogéniques (figure 6) et favoriser la synthèse d'ARN, de protéines, ainsi que la prolifération cellulaire, augmentant la masse des organes.

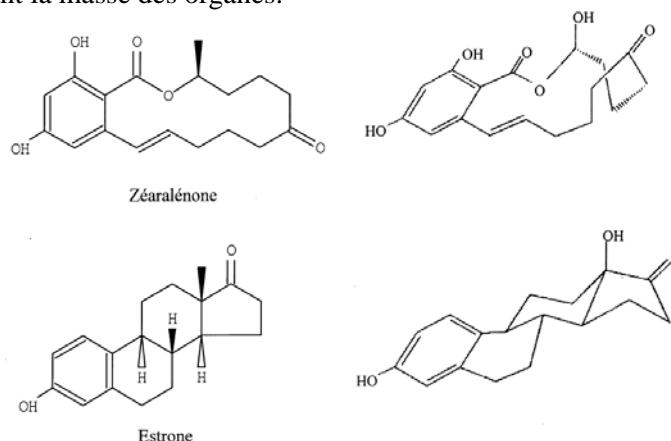


Figure 6 : Zéaralénone et œstrone

#### 3.4.2 Les effets sur les fonctions de reproduction

Bien que les preuves de l'effet de la ZEA sur l'homme restent encore hypothétiques, elle peut néanmoins constituer un danger potentiel de par sa présence à différents niveaux de la chaîne alimentaire. En effet, la ZEA et/ou ses dérivés ont été mis en évidence dans le sang de certains des enfants. Les principaux effets observés étaient des phénomènes de gynécomastie et de puberté précoce. Plus récemment, des effets sur le développement de jeunes filles et la présence de ZEA et de ses métabolites dans le sang a été établie (Massart & Sagges, 2010 ; Massart *et al.*, 2008).

Les effets les plus importants de la mycotoxine et de ses dérivés sont observés sur les fonctions de reproduction, par interaction avec les hormones sexuelles endogènes. Ces effets chez les rongeurs sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Effets de la ZEA chez les rongeurs et les lagomorphes (Gaumy et al., 2001)

Animal	Zéaralénone	Durée	Symptômes et lésions
Lapins de 4 mois	0,5-1ppm	18j	Augmentation du gain de poids  Densité osseuse très augmentée Elévation : hémoglobinémie, VGM, phosphotamie, calcémie
Lapins de 8 mois	1-4ppm		Tendance inverse
Rats en croissance		Administration prolongée	Retard de croissance Diminution du poids de la carcasse Hypertrophie du foie
Rats		8 semaines	Poids des gonades diminué Modification de la maturation folliculaire et de la spermatogénèse Hypertrophie utérus
		Plus de 8 semaines	Taux diminué de fertilité de 25-30% Modifications des organes reproducteurs
Cobayes femelles	21 mg/kg PV VO	8 jours suivant accouplement	14 jours après l'administration : 25% des femelles sont en gestation
	7-14 mg/kg PV VO		Développement fœtale normal
	20 mg/kg PV VO	3 premiers jours	60% sont gestantes 22 jours après
	30 mg/kg PV VO	Après accouplement	25% sont gestantes 22 jours après
	20-30 mg/kg PV VO	4 <sup>ème</sup> au 5 <sup>ème</sup> j ou 6 <sup>ème</sup> au 7 <sup>ème</sup> après accouplement	Gestation normale
Hamsters nouveau-nés	1mg/animal SC	2 j après la naissance	Cycles normaux Masculinisation des femelles
Souris nouveau-nées femelles	1µg	quotidiennement 5 jours sur 7 pendant 8mois	0 corps jaune chez 74% des souris Métaplasie squameuse épithélium utérin chez 59% des souris Altération épithélium vaginal chez 32% des souris
Souris nouveau-nées femelles	5-30µg/animal	1 à 10 jours	Oestrus permanent Stérilité
	10-30µg/ animal	Quotidiennement pendant 3 à 5 jours	Infertilité Apaississement épithélium vaginal

### 3.4.3 Cancérogénicité

Des études de cancérogénicité ont été réalisées chez la souris et le rat. Chez la souris, ingérant une nourriture contaminée à raison de 50 ou 100 ppm de zéaralénone pendant 103 semaines, il a été noté une fréquence anormale d'adénomes hépatocellulaires chez les femelles qui ont ingéré 100 ppm de zéaralénone (NTP, 1982). Des adénomes hypophysaires sont également observés chez les mâles et les femelles ayant ingéré 100 ppm de zéaralénone.

Chez le rat, l'administration d'une ration contenant 25 ou 50 ppm de zéaralénone pendant 103 semaines, représentant l'équivalent de 1 à 2 mg/kg de poids vif, n'entraîne l'apparition d'aucun processus tumoral, seule une diminution du gain de poids par rapport aux animaux témoins est observée (NTP, 1982).

La zéaralénone induit des cancers hépatiques et des cancers de la glande pituitaire, mais à des doses nettement supérieures aux doses engendrant un effet hormonal (WHO, 2002).

La zéaralénone et le zéaralanol sont suspectés d'être responsables de changements pubertaires chez de jeunes enfants à Porto-Rico. Les signes observés sont des naissances prématurées, une puberté précoce et une gynécomastie pré-pubertaire. Le sang de ces malades contenait de la zéaralénone et de ses dérivés (Saenz, 1984 et 1985). D'autre part, il a été mis en évidence que la ZEA stimulait la croissance des cellules cancéreuses du sein (Ahamed *et al.*, 2001 ; Withanage *et al.*, 2001). Chez les humains, l'intoxication par la ZEA peut induire une prolifération des cellules hormono-dépendante à l'origine de tumeurs des glandes mammaires, des ovaires et de l'utérus (Kuciel-Lisieska *et al.*, 2008). Ceci provient du fait que la ZEA et ses métabolites saturer les récepteurs nucléaires ER (Chen *et al.*, 2005).

La ZEA est classée par le CIRC dans le groupe 3, c'est-à-dire qu'on ne peut se prononcer sur sa cancérogénicité.

### 3.4.4 Génotoxicité et mutagénicité

La zéaralénone n'est pas mutagène chez différentes souches de *Salmonella typhimurium* telles que TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98, et TA 100, avec ou sans activation métabolique (Bartholomew *et al.*, 1980 ; Ingerowski *et al.*, 1981). Elle induit cependant des lésions de l'ADN dans des tests de recombinaison avec *Bacillus subtilis* (Ueno & Kubota, 1976) et *Bacillus thuringiensis* (Boutibonnes *et al.*, 1978).

Elle ne provoque pas d'abbérations chromosomiques, ni d'échanges de chromatides sœurs. (IARC, 1993). Ces résultats doivent être pondérés en fonction de la dose utilisée. En effet, à la concentration de 3µg/ml, une augmentation légère des échanges de chromatides sœurs est observée sur lymphocytes humains en culture, avec ou sans activation microsomale (Cooray, 1984). A la dose de 30µg/ml, une inhibition totale de la synthèse d'ADN est constatée.

La ZEA forme des adduits à l'ADN dans le foie et le rein de souris Balb/C femelles traitées par gavage ou en intrapéritonéale avec une dose de 2mg/kg de ZEA (Pfohl-Leszkowicz A *et al.*, 1995).

### 3.4.5 Tératogénicité

Une étude chez le rat montre que l'exposition à la ZEA quelle que soit la dose administrée (4mg/kg ou 8mg/kg de poids corporel) se traduit par une augmentation du nombre de fœtus mort, et à un retard de développement avec une diminution du poids (Collins *et al.*, 2006).

L'exposition d'oocytes à 7,5 µM d' $\alpha$ -zéaralénol et de  $\beta$ -zéaralénol (30µM) diminue le taux de maturation à l'origine de malformations (Alm *et al.*, 2002). Par contre, les porcs dont les mères ont ingérés de la ZEA lors du premier trimestre de gestation n'ont pas de malformation au niveau hépatique ni au niveau de la rate.

La ZEA et ses métabolites semblent avoir plus des effets foetotoxiques qu'embryotoxiques.

### 3.5 Effet de la ZEA sur les animaux

La ZEA a des effets chez la vache laitière, l'agneau, le lapin et le singe. Mais c'est l'espèce porcine qui est de loin la plus sensible à l'exposition à la ZEA (Fink-Gremmels & Malekinejad, 2007).

#### 3.5.1 Porcins

Elle entraîne des phénomènes d'hyperœstrogénisme, incluant des œdèmes du vagin, une atrophie des ovaires et une hypertrophie des glandes mammaires. On note un prolapsus de la vulve (figure 7).



Figure 7 : Prolapsus vaginale chez la truie et le nouveau-né (photos gracieusement données par BIOMIN®)

L'absorption de cette toxine par des jeunes porcs provoque une féminisation avec atrophie des testicules et un développement des glandes mammaires. Chez les truies matures, la ZEA inhibe l'ovulation et réduit la taille des portées car il peut y avoir rupture du placenta. De plus ceci entraîne des malformations au niveau du squelette de l'animal et plus particulièrement au niveau des ses membres (figure 8).



Figure 8 : Malformation des membres du porc suite à une ingestion de ZEA par la mère (photo gracieusement donnée par BIOMIN ®)

La ZEA affecte aussi la fonction de reproduction du mâle dû à une diminution du taux de testostérone, du poids du testicule et de la spermatogénèse associée à une féminisation suivie d'une baisse de libido.

Des signes cliniques ont été observés lorsque le bétail a reçu de la nourriture moisie apportant 12-14 mg/kg de poids corporel. Les signes apparaissent généralement lorsque la teneur en ZEA dans l'aliment dépasse 1ppm, bien que des effets aient été observés lors d'une contamination par des doses 10 fois plus faibles (100 à 200 ppb). L'administration de 2 ppm de ZEA au 30<sup>ème</sup> jour de gestation à des truies n'altère pas la fonction de reproduction de la mère. Par contre des effets d'hyperœstrogénisme sont observés au niveau testiculaire, utérin et ovarien des petits porcs à l'âge de 21 jours. La ZEA et le zéaralénol interagissent avec les récepteurs cytosoliques œstrogéniques au niveau de l'utérus, du foie, des glandes mammaires, de l'hypothalamus. Ils entrent en compétition avec le 17- $\beta$ -œstradiol. La zéaralénone se fixe de manière irréversible sur le récepteur des œstrogènes. Les métabolites de la ZEA,  $\alpha$ -zéaralénol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL),  $\alpha$ -zéaralanol ( $\alpha$ -ZAL), et  $\beta$ -zéaralanol ( $\beta$ -ZAL) sont beaucoup plus œstrogéniques que la ZEA elle-même. L'  $\alpha$ -ZAL et  $\alpha$ -ZOL ont le même potentiel œstrogénique que le 17 $\beta$  œstradiol. Ces métabolites sont rapidement formés dans l'organisme, et suivent le cycle entérohépatique (Danicke *et al.*, 2005).

La ZEA provoque l'accumulation de glycogène dans le foie et les muscles squelettiques. Cette accumulation est due à une augmentation de la sécrétion d'insuline. L'insulinémie s'accompagne d'une baisse de la glycémie. D'autre part, la ZEA provoque aussi l'accumulation de triglycérides dans le foie (Nogowski, 1996). En outre, sa toxicité pour les animaux d'élevage (notamment les porcs) pose un problème concernant la qualité de la viande, qui peut être de qualité nutritionnelle moindre. Les problèmes œstrogéniques apparaissent lorsque l'animal est exposé à 1mg/animal/j. Sur cette base là, une nourriture contenant 335-500 ppb provoque des problèmes œstrogéniques pendant la gestation (nourriture consommée 2-3kg/j). Une nourriture contaminée à raison de 167-250 ppb posera un problème chez les truies lors de la lactation (nourriture consommée 5-6kg) (Gimeno & Martins, 2008).

### 3.5.2 Bovins

Des problèmes d'infertilité des vaches laitières ont été associés à l'ingestion de foin contaminés par la ZEA (Mirocha *et al.*, 1968). Des doses supérieures à 500 µg/kg d'aliment entraînent une baisse de la fertilité (Linn & Chapmann, 2002). 90% de la ZEA est métabolisée par le rumen en alpha zéaralénone qui a une activité œstrogénique 4 fois plus importante que la ZEA (Kiessling *et al.*, 1984). Une faible proportion de ZEA est excrétée dans le lait des bovins sous forme de ZEA ou de ses métabolites (alpha et beta ZEA) (Mirocha *et al.*, 1981) avec un taux cumulatif équivalent à 0,06%.

### 3.5.3 Animaux de compagnie

En dépit de la prévalence marquée des céréales dans les ingrédients des aliments pour animaux familiers, moins de recherche ont été consacrées aux mycotoxines de *Fusarium* par rapport aux aflatoxines et ochratoxines. Un certain nombre d'enquêtes, cependant, ont montré qu'elles sont présentes en quantité significative dans les aliments pour animaux de compagnie.

Le mâle et la femelle chien sont affectés par la zéaralénone (Hidy *et al.*, 1977). Chez les chiens gavés avec de la zéaralénone à 5 mg/kg pc / jour pendant 13 semaines, on note la réduction du nombre de corps jaune et l'arrêt de la spermatogénèse respectivement chez les femelles et les mâles chiens. Bien que la dose utilisée par Hidy *et al.* (1977) soit beaucoup plus élevée que l'exposition alimentaire normale, certaines études suggèrent que l'exposition à des faibles concentrations en ZEA peut produire des effets toxiques. Les chiennes nourries avec de la ZEA à 200 µg/kg pc/jour pendant sept jours ont montré des dommages dans les cellules des ovaires, de l'oedème et une hyperplasie des oviductes et de l'utérus (Gajecka *et al.*, 2004a). Chez les chiens, on observe une réduction d'anticorps et de globules blancs dans le sérum après 50 jours d'exposition alimentaire à la ZEA à 50 mg/kg pc / jour (Gajecka *et al.*, 2004b). Dans des élevages de chiens, il a été observé une diminution de la conception, une augmentation de nombre de chiots mort-nés. Dans la nourriture de ces élevages, la ZEA était en quantité faible mais elle a pu causer ces problèmes par une prise au long court (Mellor, 2003).

## 4. La citrinine (CIT)

### 4.1 Origine et structure de la CIT

La citrinine est un métabolite secondaire qui a été isolé pour la première fois à partir de *Penicillium citrinum* (1931). Les premières études menées sur cette molécule ont mis en évidence une action antibactérienne : bactériostatique et bactéricide contre les bactéries gram positive. La CIT a alors été utilisée comme antibiotique mais ses propriétés toxiques ont interdit toute utilisation en thérapeutique (Ambrose *et al.*, 1945, 1946).

La CIT est un polyacétate, fluorophore naturel dans le jaune. Elle est composée d'une unité coumarique (figure 9) et sa formule chimique est le 4,6-dihydro-8-hydroxy-3, 4, 5-triméthyl-6-oxo-, (3Rtrans)-3H-2-Benzo-pyran-7-carboxylic acide. La toxine citrinine H1 peut se former par la liaison entre deux molécules de CIT. L'équipe d'Hirota (2002) a déterminé un autre produit de décomposition, la citrinine H2 qui correspond à l'ouverture du cycle (figure 9). Ce composé H2 a une action cytotoxique plus faible que la citrinine.

Les principales espèces de moisissures productrices de CIT appartiennent aux genres *Aspergillus* & *Penicillium* et peuvent produire également l'OTA. Une espèce de *Monascus* produit aussi de la CIT. Ces champignons sont essentiellement des contaminants des céréales : maïs, riz, blé, seigle, orge, avoine, en cours de stockage (Scudamore *et al.*, 1997).

La CIT est aussi retrouvée dans les fruits : tomates, pommes et jus de pomme et les colorants naturels utilisés dans la nourriture traditionnelle orientale (Sabater *et al.*, 1999; Blanc *et al.*, 1995; Vinas *et al.*, 1993).

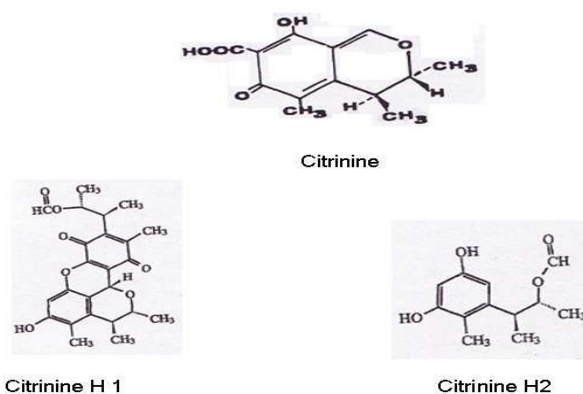


Figure 9 : Structure de la citrinine et des composés de dégradation formés à partir de la CIT

## 4.2 Exposition de l'homme

Les études réalisées jusqu'à présent sur la présence de la CIT dans les produits alimentaires, sont peu nombreuses et ne permettent pas d'établir un niveau réel d'exposition de l'homme à cette toxine. Néanmoins en Bulgarie une forte proportion d'échantillons de maïs et haricot sont contaminés par la citrinine (Pekova-Bocharova *et al.*, 1991; Vrabecheva *et al.*, 2000; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002).

Dans ces régions, la contamination par la CIT peut atteindre des taux de 420 µg/kg (Vrabecheva *et al.*, 2000). La CIT est très souvent associée à l'OTA (céréales du petit déjeuner, blé, riz). Elle a été retrouvée dans l'alimentation de familles souffrant de néphropathie endémique des Balkans (Tozlovanu, 2008). Cette association peut être liée soit à la présence de champignons coproducteurs de CIT et d'OTA, ou à des souches différentes. Un phénomène de synergie avec l'OTA peut donc se produire et compliquer l'attribution des effets toxiques à l'OTA seule (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002b; Molinié, 2004).

## 4.3 Toxicocinétique

La CIT est rapidement absorbée, et persiste dans le sang au moins 24h après administration. Lors d'une injection intraveineuse, elle est retrouvée dans les urines après 48h chez le chien, et 24 h dans le sang chez le rat; son produit de réduction, la dihydrocitrinone (citrinine H2), est isolé dans l'urine 8h à 48h après le traitement (Dunn *et al.*, 1983).

Au niveau du rein, la CIT est transportée par le système de sécrétion des anions organiques (Berndt, 1983). Il existe une compétition entre la CIT et l'OTA pour ce transporteur (Jung *et al.*, 2001). La présence simultanée d'OTA et de CIT modifie la toxicocinétique de la CIT (Molinié, 2004).

## 4.4 Effets toxiques

### 4.4.1 Néphrotoxicité et hépatotoxicité

La CIT est hépatotoxique et néphrotoxique chez un grand nombre d'espèces et a été impliquée avec l'OTA comme un agent potentiel de la BEN (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002b).

La CIT provoque des lésions rénales au niveau des tubules proximaux, caractérisées par l'apparition de protéinurie, glucosurie et d'infiltration de leucocytes. Ces altérations rénales seraient liées à une perturbation de l'homéostasie calcique, avec une accumulation du calcium au niveau cortical.

Elle modifie les fonctions rénales chez le chien, le poulet, le lapin et le rat (Krejci *et al.*, 1996 ; Glahn *et al.*, 1989). Les effets observés sont proportionnels aux doses administrées et varient selon la voie d'administration. Le gavage de porcs par de la nourriture contaminée à 200 ppm de CIT, pendant 1 ou 2 mois, induit une néphropathie (Krogh *et al.*, 1968)

La CIT agit sur le métabolisme hépatique en diminuant le glycogène hépatique et en augmentant le glucose sanguin (Gupta *et al.*, 1979). Des études menées *in vivo* par Endo & Kuroda, (1980) ont montré, l'effet inhibiteur de la CIT sur la biosynthèse des triglycérides et du cholestérol au niveau du foie de rat.

#### 4.4.2 Génotoxicité et mutagénicité

La CIT est négative avec le test classique d'Ames sur *Salmonella*. Par contre, elle induit des cassures simple et double brins au niveau de l'ADN d'*Escherichia coli* (Martin *et al.*, 1986). La CIT induit des aberrations chromosomiques après une activation métabolique par des hépatocytes de rat (Sabater *et al.*, 1999) et des fragmentations acentriques des chromatides au niveau des cellules de la moelle osseuse chez les souris (Jeswal *et al.*, 1996).

Liu et son équipe en 2003 n'ont pas observé de potentiel clastogène de la CIT sur des cellules de mammifères. Par contre, Lebrun et Follman, en 2002, mettent en avant un faible effet génotoxique (par comet assay) sur des cellules de rein de chien (MDCK). Bien que la CIT soit considérée comme n'étant pas cancérogène, il a été montré qu'une exposition à la CIT à long terme induit des adénomes rénaux chez le rat. La citrinine est génotoxique puisqu'elle est responsable de la formation d'adduit à l'ADN *in vitro* et *in vivo* (Molinié, 2004; Tozlovanu *et al.*, 2006b ; 2006c; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007; Tozlovanu *et al.*, 2008).

L'administration simultanée d'OTA (25 mg/kg) et de CIT (200 mg/kg) augmente l'incidence des tumeurs rénales chez les souris DDD mâle en comparaison à un traitement avec de l'OTA seule (Kanisawa, 1984). Jeswal (1995) a observé une augmentation des tumeurs rénales chez des souris traitées par voie orale simultanément avec 50µM d'OTA et 50µM de CIT.

Des néoplasmes ont été observés sur des reins de porc âgés de deux ans, qui avaient consommé des nourritures contaminées par de l'OTA et d'autres mycotoxines dont la CIT (IARC, 1993). Ces résultats impliquent un accroissement potentiel du risque de développement de cancer lorsque les individus ingèrent des nourritures contaminées par ces deux mycotoxines.

## 5. La fumonisine B1 (FB<sub>1</sub>)

### 5.1 Origine et structure de la FB<sub>1</sub>

C'est en 1988, que Gelderblom *et al.*, et Benzuidenhout *et al.*, ont identifié les fumonisines, à partir de cultures de *Fusarium moniliforme*. Les fumonisines sont réparties en 4 séries : FA, FB, FC et FP (figure 10 et tableau 2).

La FB<sub>1</sub> est principalement produite par *Fusarium verticillioides*, champignon qui contamine plus particulièrement le maïs (Scott, 1993 ; Norred, 1993).

La FB<sub>1</sub> est un diester de l'acide 1, 2, 3 propane tricarboxylique et du 2-amino- 12,16-diméthyl 3, 5, 10, 14, 15- pentahydroxyecosane (figure 10). A l'heure actuelle, 28 FBs différentes ont été dénombrées. Ces substances sont des diesters de l'acide 1, 2, 3 propane tricarboxylique et du 2-amino- 12, 16 diméthyle 3, 5, 10, 14, 15-pentanehydroxyecosane (FB<sub>1</sub>).

La fumonisine B<sub>1</sub> a une structure proche de celle de la sphingosine et de la sphinganine (figure 11) (sphingolipides membranaires). Cette similarité de structure est à l'origine de l'inhibition de la biosynthèse des sphingolipides.

Les fumonisines sont des composés très polaires, solubles dans l'eau. Leur solubilité est plus importante dans le méthanol et dans le mélange acétonitrile – eau (1v :1v). Elles sont insolubles dans les solvants non polaires.

La FB<sub>1</sub> est relativement stable dans la plupart des conditions utilisées pour le traitement des denrées alimentaires.



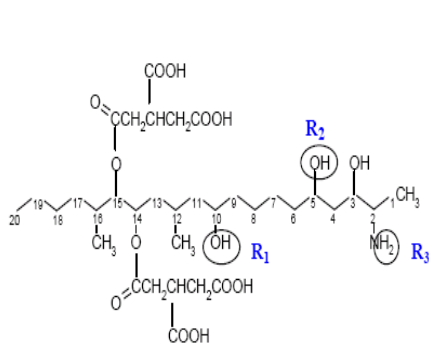


Figure 10 : Structure de la FB1

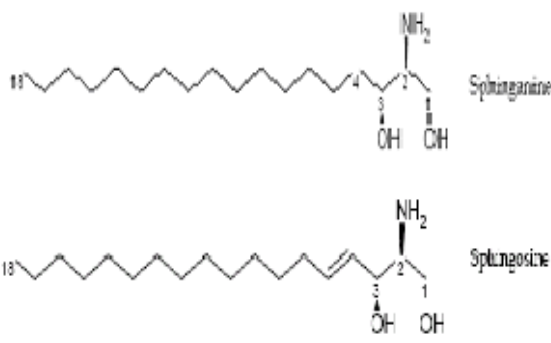


Figure 11 : Structure de la sphinganine et de la sphingosine

Tableau 2 : Structure chimique des fumonisines (d'après Pfohl-Leszkowicz, 1999)

Type de fumonisines	R1	R2	R3
Fumonisine A <sub>1</sub>	—OH	—OH	—NHCOCH <sub>3</sub>
Fumonisine A <sub>2</sub>	—H	—OH	—NHCOCH <sub>3</sub>
Fumonisine B <sub>1</sub>	—OH	—OH	—NH <sub>2</sub>
Fumonisine B <sub>2</sub>	—H	—OH	—NH <sub>2</sub>
Fumonisine B <sub>3</sub>	—OH	—H	—NH <sub>2</sub>
Fumonisine B <sub>4</sub>	—H	—H	—NH <sub>2</sub>
Fumonisine C <sub>1</sub>	—OH	—OH	—NH <sub>2</sub>
Fumonisine C <sub>2</sub>	—H	—OH	—NH <sub>2</sub>
Fumonisine C <sub>3</sub>	—OH	—H	—NH <sub>2</sub>
Fumonisine C <sub>4</sub>	—H	—H	—NH <sub>2</sub>
Fumonisine P <sub>1</sub>	—OH	—OH	—OH-Pyr
Fumonisine P <sub>2</sub>	—H	—OH	—OH-Pyr
Fumonisine P <sub>3</sub>	—OH	—H	—OH-Pyr

## 5.2 Exposition de l'homme

Les fumonisines se sont révélées être des contaminants fréquents du maïs et de ses sous-produits mais aussi du sorgho et du riz.

Le tableau 3 donne une idée de la présence respective de FB<sub>1</sub> et FB<sub>2</sub> trouvées dans les dérivés du maïs. Les niveaux de contamination observés sont parfois très élevés et responsables d'intoxications animales aiguës.

Tableau 3 : Présence respective de FB1 et de FB2 dans les dérivés de maïs, à l'origine de mycotoxines (d'après Pfohl-Leszkowicz A, 1999)

Maïs	Mycotoxicoses	Pays	Taux maximal (µg/kg)	
			FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>
Produits pour animaux				
Maïs sélectionné	Œdème pulmonaire porcin	USA	330	48
Maïs sélectionné	Leucoencéphalomalacie	USA	160	49
Maïs				
Consommation locale	Cancer œsophage	Chine	155	-
Maïs				
Consommation locale	Cancer œsophage	Transkei	117	23
Maïs exporté au Japon		USA	4,1	10,2
Maïs exporté en Afrique du Sud		USA	7,6	3,1
Produits commerciaux pour nourriture humaine				
Blue Corn meal		USA	6,8	-
Semoule de maïs			2,8	1,1
Maïs extrudé et polenta		Italie	6,1	0,9
Chips de maïs		Pays –Bas	2395	715
Maïs doux		"	1089	658
Pop corn		"	1003	273
Corn Flakes			1281	466
Farine de maïs		"	608	ND
Aide humanitaire		Zimbabew	3,6	0.9

La FB<sub>1</sub> est la mycotoxine la plus fréquemment retrouvée de par le monde. Le problème est que les épis de maïs peuvent avoir de fortes teneurs en fumonisines tout en ayant une apparence normale (c'est-à-dire sans pourriture ni décoloration des graines). En Transkei, le maïs moisi est utilisé pour la fabrication de bière à cause de la saveur qu'il lui donne. On en retrouve dans tous les pays du monde à des taux parfois élevés. On retrouve aussi de grande quantité dans les farines et gruaux. À moindre degré (de 0,01 à 0,08 µg/g), le pop-corn, le maïs doux et le maïs concassé ou bouilli sont contaminés de manière sporadique (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

En Indes, la consommation par l'homme de maïs ou sorgho contenant des concentrations supérieures à 64 mg/kg de FB<sub>1</sub> a été associée à des symptômes gastro-intestinaux. La FB<sub>1</sub> seule ou en association avec d'autres mycotoxines (fusarine C, moniliformine, aflatoxine) contribuerait à l'apparition de certains cancers de l'œsophage et du foie (Rheeder *et al.*, 1992 ; Ueno *et al.*, 1997). La découverte des fumonisines est en fait liée à des recherches effectuées sur le cancer de l'œsophage humain (OC) dans la région sud africaine «Transkei» (IARC (1993). Selon les lieux, il a été dénombré jusqu'à 200 cas d'OC pour 100 000 personnes alors que la prévalence habituelle est de 5 cas sur 100 000. D'autres régions du monde ont également un taux anormalement élevé de cancer de l'œsophage comme la province de Linxian en Chine où l'incidence est de 100-150 cas pour 100 000 habitants ou le Nord de l'Iran.

La contamination du maïs par *F. moniliforme* est positivement corrélée aux cancers de l'œsophage. Ce champignon produit des fumonisines mais également de la fusarine C et de la moniliformine. Une différence significative de la quantité de fumonisine dans le maïs entre les régions à fort taux de cancers de l'œsophage et celles à faible taux est observée dans différentes régions du monde : Afrique (Marasas *et al.*, 1988a ; Thiel *et al.*, 1992), Amérique Centrale, Asie (Groves *et al.*, 1999), en Iran (Shephard *et al.*, 2000). Le maïs peut, en Afrique du Sud, être contaminé jusqu'à 140 mg/kg certaines années alors qu'en Caroline du Sud, où le taux d'OC est également important, les quantités sont de 0,17 à 2,4 mg / kg de FB<sub>1</sub> et de FB<sub>2</sub> combinées. Dans les bières faites 'maison' en Afrique du Sud, le taux de FB<sub>1</sub> s'échelonne entre 38 et 1066 µg/l et le taux des trois FB entre 43 et 1329 µg/l. Avec de tels taux, les doses tolérables de 2µg/kg poids corporel sont largement dépassées (Wagacha & Muthomi, 2008).

Une association entre la consommation de maïs en Italie (région de Pordenone) et les cancers du pharynx et de l'œsophage a clairement été établie. Dans cette région, la majorité du maïs produit localement est ingérée sous forme de polenta. Il a été trouvé entre 150 et 3760 ng/kg de FB<sub>1</sub> dans des échantillons de polenta. En Chine, dans le Linxian où on dénombre un grand nombre de cancers de l'œsophage, les taux de FB<sub>1</sub> vont de 18 à 155 mg/kg avec en plus présence d'aflatoxines et de trichothécènes. Une étude récente indique que la FB<sub>1</sub> toute seule ne peut pas être responsable des cancers de l'œsophage mais y contribuerait par son effet promoteur (Sammon, 2007).

### 5.3 Toxicocinétique

La quantité de FB<sub>1</sub> mesurée dans le plasma après une administration par voie orale chez le porc, la poule pondeuse, le singe, la vache, le rat et le canard est très faible. Ceci provient du fait que les fumonisines sont absorbées comme les lipides *via* les chylomicrons dans la lymphe et non pas *via* la voie sanguine (Mahfoud *et al.*, 2002).

Lors d'une administration par voie orale chez le rat et le porc, la FB<sub>1</sub> est retrouvée dans la plupart des tissus notamment le foie et les reins (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Peu de données sont disponibles sur le métabolisme de la FB<sub>1</sub>. Cependant la principale forme d'excrétion biliaire et urinaire est la molécule mère. Chez le singe, une fraction de FB<sub>1</sub> retrouvée dans les fèces est sous une forme partiellement hydrolysée (mono-esters par perte d'un acide propane-tricarboxylique), alors que la fraction retrouvée dans l'urine est composée à 96% de FB<sub>1</sub> non hydrolysée.

## 5.4 Effets toxiques

### 5.4.1 Effet sur les sphingolipides

Le mécanisme d'action de la FB<sub>1</sub> repose sur l'analogie structurale entre la toxine et la sphingosine. Cette analogie est à l'origine de l'inhibition de la N-acyltransférase et de la perturbation de la biosynthèse des sphingolipides (figure 12).

Les sphingolipides sont des lipides complexes ayant un rôle important à jouer dans la transduction du signal et la constitution des membranes. Les sphingolipides sont des médiateurs régulant entre autre le taux de calcium cellulaire, la progression cellulaire et l'apoptose (mort cellulaire programmée) (Pfohl-Leszkowicz, 2009). Cela se traduit, sur le plan cellulaire par l'accumulation de sphinganine, parfois de sphingosine, qui sont deux composés hautement réactifs pouvant perturber le bon fonctionnement de la machinerie cellulaire.

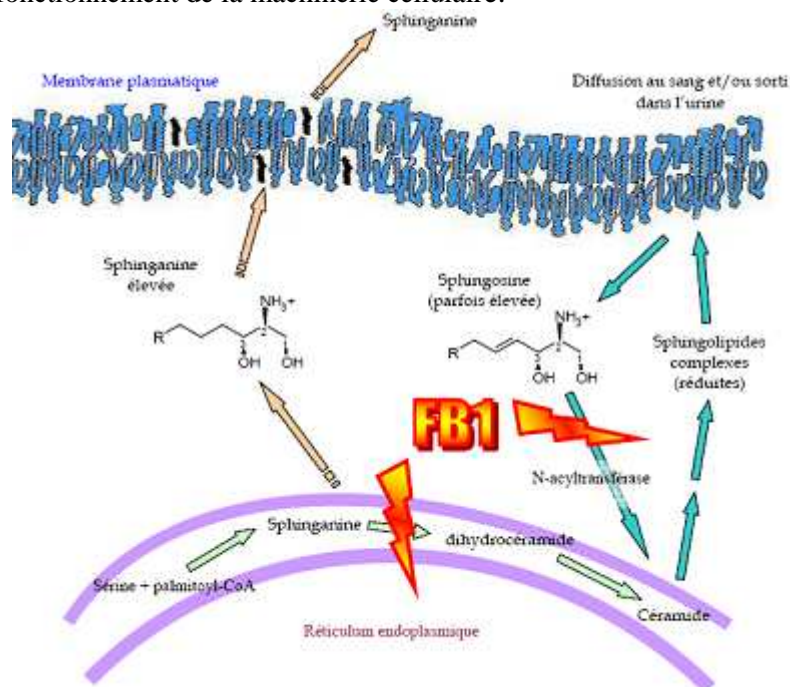


Figure 12 : Effets de la FB<sub>1</sub> sur le métabolisme des sphingolipides (D'après Merrill *et al.*, 2001)

La fumonisine modifie la transduction du signal (Pinelli, 1999b ; Poux, 2000) et de ce fait aurait un effet promoteur (WHO, 2000 ; WHO, 2002). La FB<sub>1</sub> perturbe toute la chaîne lipidique avec un effet sur le taux de cholestérol et sur les acides gras poly insaturés. Ceci a pour effet de perturber la fluidité membranaire, mais également le bon fonctionnement des enzymes (Burger *et al.*, 2007). L'accumulation de sphingosine et sphinganine ainsi que de la sphinganine phosphate et sphingosine phosphate dans les urines est corrélée avec l'exposition aux fumonisines et à l'excrétion de la FB<sub>1</sub> dans les urines. Ils reflètent l'inhibition des enzymes du cycle sphingomyéline. Ils peuvent servir de biomarqueurs d'exposition et de susceptibilité dans les études épidémiologiques (Cai *et al.*, 2007). La mesure de l'excrétion urinaire de FB<sub>1</sub> est corrélée à l'ingestion de tortilla contaminée en FB<sub>1</sub> (Gong *et al.*, 2008).

Une intoxication de courte durée (4 jours à 4 semaines) entraîne principalement une hépatotoxicité avec cirrhose (hyperplasie hépatocellulaire) et prolifération des canaux biliaires et une néphrotoxicité avec des images d'autophagocytose et de dégénérescence cellulaire dans le cortex dès 15 mg FB<sub>1</sub>/kg d'aliment (Riley *et al.*, 1994).

### 5.4.2 Cancérogénicité

Les propriétés cancérogènes et cytotoxiques de la FB<sub>1</sub> ont été mises en évidence chez le rat et la souris mais n'ont pas encore été démontrées chez d'autres espèces même si des expositions chroniques de porcs à de fortes doses de FB<sub>1</sub> ont entraîné l'apparition de nodules d'hyperplasie hépatique (Casteel *et al.*, 1993).

Dans l'espèce humaine, les fumonisines pourraient être impliquées dans certains cancers de l'œsophage (Norred *et al.*, 1993; IARC, 1993).

Après une exposition de longue durée (50 mg FB<sub>1</sub>/kg d'aliment, 150 jours à 2 ans) diverses équipes ont noté la formation de carcinomes hépatocellulaires, de cirrhose, d'adénofibrose, de nodules néoplasiques et de cholangiocarcinome (Gelderblom *et al.*, 2001).

Trois études ont été effectuées chez le rat avec des nourritures contaminées par *Fusarium moniliforme*. Des hépatocarcinomes et des cancers de l'estomac non glandulaire ainsi que des cholangiosarcomes ont été observés. Il est à noter que ces extraits contenaient non seulement des FB, mais également de la fusarine C et de la moniliformine. Il n'était donc pas possible d'attribuer ces effets aux seules FB (IARC, 1993).

En 1999, l'étude du NTP (*National Toxicological Program*) a montré que la FB<sub>1</sub> est cancérogène chez le rat et la souris, mais l'organe cible n'est pas le même. Des rats Fischer F344 (mâle et femelle) et des souris B6C3F<sub>1</sub> (mâle et femelle) ont été traités par 0, 5, 50, 80, 150 ppm de FB<sub>1</sub> dans la nourriture pendant 2 ans. Respectivement avec 50 et 150 ppm, des adénomes des tubules rénaux (2/48 ; 5/48) ainsi que des carcinomes tubulaires rénaux (7/48 ; 10/48) sont observés chez les rats mâles. Chez les souris femelles, des doses de 50 et 80 ppm provoquent de l'apoptose hépatique (7/47 ; 14/45), des adénomes hépatiques (16/47, 31/45) et des carcinomes hépatiques (10/47 ; 9/45). Dans certains cas, il y a eu des métastases au niveau pulmonaire. Dans certains cas, il y a eu des métastases au niveau pulmonaire. Il n'y a eu aucun effet chez les rats femelles et les souris mâles. L'exposition de rat Fischer F344 pendant 5 semaines à la FB<sub>1</sub> a induit des cancers hépatiques un an après l'arrêt de l'exposition, prouvant que l'effet initiateur est irréversible (Lemmer *et al.*, 2004).

La FB<sub>1</sub> est un cancérogène complet puisqu'elle induit des cancers en mettant en jeu des mécanismes d'initiation mais également un effet promoteur (Gelderblom *et al.*, 2002). Cet effet promoteur serait dû à l'induction de la forme placentaire de la glutathion-S-transférase au niveau hépatique.

Associée à l'OTA, la FB<sub>1</sub> entraîne des nodules au niveau rénal chez le porc (Stoev *et al.*, 2011).

La dose sans effet (DSE) pour le cancer du rein chez les rats est de 0,67 mg/kg de poids corporel/j alors que pour la toxicité rénale, la DSE est de 0,2 mg/kg. Pour la souris, la DSE vis-à-vis du cancer hépatique est de 0,8mg/kg et 1,9 mg/kg/j pour le rat mâle et la souris femelle respectivement (WHO, 2002).

### 5.4.3 Génotoxicité et mutagénicité

La FB<sub>1</sub> n'est pas mutagène dans le test d'Ames avec les souches TA 100, TA 98 ou TA 97. Elle n'induit pas non plus la réparation SOS, ni la synthèse non programmée d'ADN. Elle ne forme pas d'adduit à l'ADN, par contre elle induit des cassures simple brin ainsi que des aberrations chromosomiques et des micronoyaux (IARC, 2002).

### 5.4.4 Tératogénicité

La FB<sub>1</sub> affecte les fœtus chez les rates en gestation engendrant des portées de poids plus faibles et un développement moindre du squelette fœtal.

Lors d'études *in vitro*, il a été montré que la FB<sub>1</sub> est embryotoxique, elle diminue la croissance et le développement des embryons de rats. La FB<sub>1</sub> est aussi potentiellement embryotoxique et tératogène chez les volailles (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

## 5.5 Effets de la FB<sub>1</sub> sur les animaux

Dans plusieurs espèces, comme les équidés, les suidés, les ovins, les rongeurs et les primates, une toxicité hépatique et rénale a également été observée, ainsi qu'une réduction du poids vif et une altération de l'indice de consommation alimentaire chez les oiseaux.

### 5.5.1 Cheval

Les fumonisines sont responsables lors d'une toxicité aigüe de la leucoencéphalomalacie chez les équidés (Marasas *et al.*, 1988b). La maladie est connue sous plusieurs noms: ELEM (*Equine LeukoEncephaloMalacia*), *Blind Staggers* (littéralement : l'aveugle qui titube), *foraging disease* (la maladie du fourrage), *corn stalk disease* (la maladie de la tige de maïs) ou encore *moldy corn poisoning* (l'intoxication au maïs moisi). Elle se développe en plusieurs étapes : inappétence, gonflement des lèvres et du nez, une cyanose ou des hémorragies au niveau des muqueuses, léthargie (sommeil maladif sans fièvre), puis les effets neurotoxiques deviennent apparents. Les mouvements ne sont plus coordonnés, le cheval titube, puis surviennent des convulsions, conduisant inéluctablement à la mort. Les rares cas de récupération s'accompagnent de séquelles neurologiques sévères et définitives. En France dans le Sud-ouest, entre 1994 et 1996, 20 chevaux sont morts de ce type d'affection (Bailly *et al.*, 1996). La mort peut être soudaine ou précédée de convulsions avec mouvements de pédalages. Au cours des épisodes d'excitation l'animal est dangereux. La mort survient en quelques heures à quelques jours après le début des troubles.

### 5.5.2 Porc

Les fumonisines sont responsables d'œdème pulmonaire chez les porcins (Colvin *et al.*, 1992). Les signes cliniques apparaissent très rapidement, 2 à 7 jours après la contamination. On note une difficulté à respirer, de la fatigue, et une cyanose. Les lésions observées montrent que les cavités thoraciques sont remplies d'un liquide jaune qui coagule au contact de l'air. Les animaux exposés à de fortes doses meurent, en général, d'œdème pulmonaire. L'exposition pendant 8 semaines à une nourriture contenant 100 ppb conduit au bout de 5 semaines à une baisse du gain de poids (Rotter *et al.*, 1996). Lors d'une exposition à des doses 10 fois plus importantes (1000 ppb = 1ppm), il y a hypercholestérolémie, atteinte du pancréas et des glandes surrénales. Les enzymes de la fonction hépatique sont augmentées : aspartate aminotransférase (ASAT), alcaline phosphatase (ALP), lactate deshydrogénase (LDH) (Rotter *et al.*, 1996). La qualité de la viande est affectée, avec accumulation de gras (Rotter *et al.*, 1997). Les doses plus faibles engendrent des hépatotoxicoses aiguës. La FB<sub>1</sub> affecte la fonction immunitaire chez le porc avec une baisse des monocytes et des neutrophiles (Müller *et al.*, 1999), la prolifération des lymphocytes et l'équilibre des cytokines (Marin *et al.*, 2007). La FB<sub>1</sub> accroît la sensibilité des porcs aux infections ou les risques d'échec de vaccinations (Oswald *et al.*, 2003 ; Halloy *et al.*, 2005).

### 5.5.3 Volailles

Chez les poulets, les fumonisines entraînent une immunosuppression (Li *et al.*, 1999). Les effets de la FB<sub>1</sub> sur les volailles sont d'autant plus importants que leur alimentation est à base de maïs. Perte de gain de poids (GMQ : gain moyen quotidien), nécrose du foie, hyperplasie biliaire et atrophie corticale du thymus, diarrhées, rachitisme et mortalité sont autant d'affections qui touchent ces animaux (Brown *et al.*, 1992 ; Ledoux *al.*, 1992). D'après Bucci et Howard (1996), il n'y aurait pas de passage de la mycotoxine dans les œufs. Weibking *et al.* (1993a) ont mesuré une augmentation de la sphinganine chez les jeunes dindons ayant consommé de la FB<sub>1</sub>. Cette augmentation est aussi observée chez le poussin et les canards exposés à des aliments contaminés par plusieurs dizaine voire centaine de mg/kg (Tran *et al.*, 2003; Henry *et al.*, 2000). La plus petite dose entraînant une augmentation du rapport Sa/So chez le canard gras est 2mg/kg d'aliment (Tran *et al.*, 2006). Chez le poulet, cette mycotoxine a un effet immunosuppresseur (Chatterjee & Mukherjee, 1994 ; Marijanovic *et al.*, 1991).

## 6. Les aflatoxines (AF)

### 6.1 Origine et structure des Aflatoxines

A la suite d'une maladie, "Turkey Xdisease", qui affectait la volaille en Angleterre, et plus particulièrement les dindons, Sargeant et son équipe (1961) isolèrent de la nourriture des volailles, à base d'arachide, une substance capable d'induire expérimentalement la même maladie. C'était le début d'une série de recherches qui aboutit en 1965 à l'isolement et à la caractérisation de la structure des aflatoxines (Asao *et al.*, 1963 et 1965).

Les aflatoxines constituent un groupe de 18 composés structurellement proches dont quatre constituent les formes les plus couramment rencontrées dans les aliments ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ) et  $M_1$  dans le lait (figure 13). Les aflatoxines sont produites par des *Aspergillii* se développant entre autres sur les céréales et les oléagineux dans des atmosphères chaudes et humides.

Trois souches d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à synthétiser des aflatoxines, *A.flavus* produit principalement l' $AFB_1$  et  $AFB_2$  alors qu'il ne produit habituellement ni  $AFG_1$  ni  $AFG_2$ , bien que quelques rares exceptions aient été décrites (Wicklow et Shotwell, 1983).

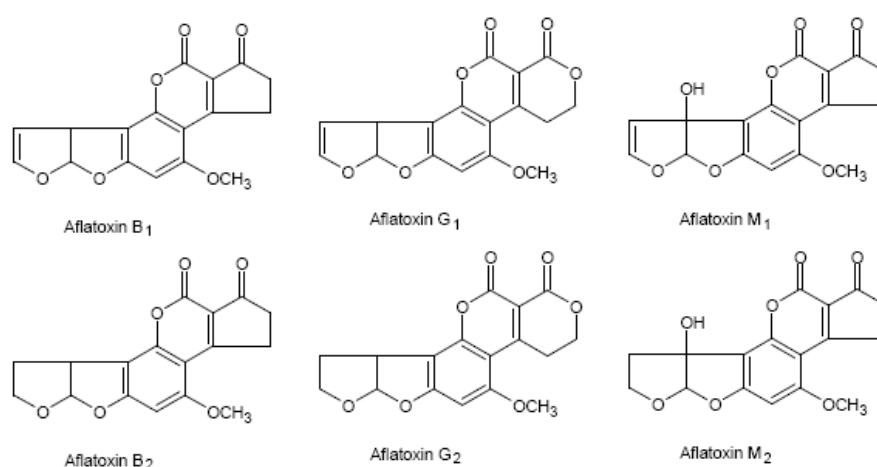


Figure 13 : Structure chimique des aflatoxines

### 6.2 Exposition de l'homme

Les aflatoxines sont généralement trouvées dans des nourritures en provenance de régions chaudes et humides, elles ont été détectées dans des produits à base de noix comestibles et leurs dérivés (arachides, noix du Brésil, pistaches, amandes, noix et noisettes), et de grains (maïs, sorgho, millet). L' $AFM_1$ , en particulier, est surtout présente dans le lait et les produits à base de lait (pour une revue voir Pfohl- Leszkowicz, 1999).

Les aflatoxines sont aussi retrouvées dans le riz (Nguyen *et al.*, 2007), dans les olives (El Aldouni *et al.*, 2006) et dans les noix (Tozlovanu, 2008).

Les mammifères ingérant une nourriture contaminée par des aflatoxines vont excréter celle-ci dans le lait sous forme du métabolite hydroxylé dénommé  $AFM_1$ . L'aflatoxine  $M_1$  est présente dans le lait de vache et les produits à base de lait (fromage ; yogourt), mais aussi dans le lait maternel, démontrant ainsi le potentiel d'exposition important des nouveau-nés dans certains pays. De l' $AFM_1$  a été retrouvée dans le lait de femme mais aussi dans le sang du cordon ombilical et de la mère dans plusieurs pays africains (Ghana, Kenya, Nigeria, Gambie, Soudan) ; aux émirats arabes ; en Chine ; en Australie ; et en Thaïlande. Les AF posent également un problème lors de la grossesse puisqu'elles traversent la barrière placentaire et se concentrent dans les tissus fœtaux. Le maïs notamment dans les régions tropicales et subtropicales est simultanément contaminé par des fumonisines, ce qui peut avoir un effet amplificateur (IARC, 1993).

### 6.3 Toxicocinétique

L'absorption peut avoir lieu par voie orale et trachéale. Elle est rapide et s'effectue au niveau de l'intestin grêle (duodénum). La distribution à partir du plasma dans les hépatocytes est réalisée par diffusion passive (Pfohl-Leskowicz, 1999).

Pour être toxique ou mutagène l'AFB<sub>1</sub> doit être métabolisée. La métabolisation de l'AFB<sub>1</sub> est principalement réalisée par l'intervention des cytochromes hépatiques. Elle peut être aussi cooxydée par la prostaglandine-H-synthétase (PGHS) et la lipooxygénase. Elle est principalement transformée en 8 métabolites : l'époxyde-AFB<sub>1</sub>, l'AFM<sub>1</sub>, l'AFB<sub>2</sub>, l'AFQ<sub>1</sub>, l'AFP<sub>1</sub>, l'aflatoxicol, l'aflatoxicol H<sub>1</sub> et l'aflatoxicol M<sub>1</sub>. Ces métabolites à l'exception de l'époxyde (AFB<sub>1</sub>-8,9-*exo*-époxyde) sont moins toxiques que l'AFB<sub>1</sub>. La figure 14 représente le schéma de la métabolisation des aflatoxines.

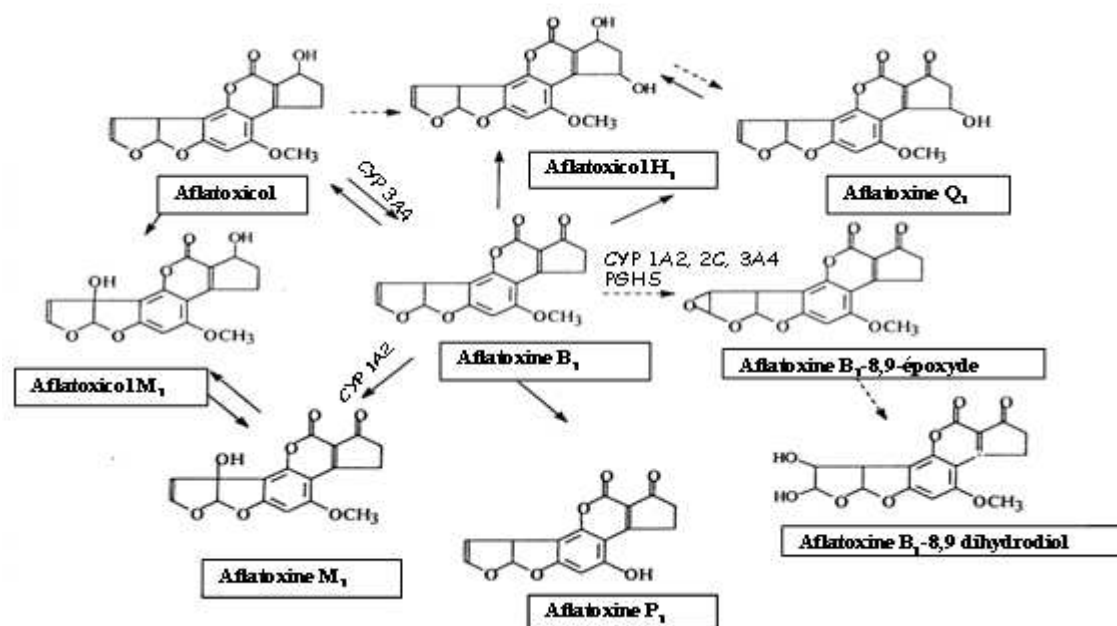


Figure 14 : Schéma de la métabolisation des aflatoxines (adaptés de Meissonnier et al., 2005)

Une partie de l'AFB<sub>1</sub> est éliminée après biotransformation dans la bile (conjugaison au glutathion ou au sulfate). La sécrétion biliaire représente 50 % de la dose excrétée chez la plupart des espèces animales. 15 à 25 % de la dose ingérée est éliminée par voie urinaire sous forme de dérivés conjugués ou sous forme inchangée (Pfohl-Leskowicz, 1999).

Cette élimination est lente chez la souris, le rat et le singe. Ceci est entre autre dû au fait que l'AFB<sub>1</sub> se fixe sur l'albumine sérique. Une petite quantité (1 à 10%) reste fixée de manière covalente aux protéines hépatiques plusieurs jours après l'administration de l'AFB<sub>1</sub> (Pfohl-Leskowicz, 1999).

Le rat, le canard et la truite sont très sensibles à l'effet cancérogène de l'AFB<sub>1</sub> alors que le singe, la souris et le hamster sont relativement résistants. Ceci peut être expliqué par la métabolisation et notamment les réactions de conjugaison au glutathion (Pfohl-Leskowicz, 1999).

Les quantités de métabolites formés et les CYP impliqués dépendent de l'espèce animale et du tissu. Chez le rat, cette activation dépend principalement du CYP 2C, mais peut aussi être réalisée par le CYP 1A2.

### 6.4 Effets toxiques

Les effets des aflatoxines sur la santé animale varient suivant l'espèce. Les animaux comme le veau, le poulet, le cobaye et le porc sont sensibles à l'AFB<sub>1</sub> alors que la chèvre, le mouton, le rat et la souris sont relativement résistants (Patterson, 1970).

L'AFB<sub>1</sub> est la plus toxique, suivie par ordre décroissant de toxicité par l'AFM<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> et l'AFG<sub>2</sub>.

### 6.4.1 Cancérogénicité

En 1971, l'activité cancérogène des AFs chez l'animal a été prouvée. En 1987, les aflatoxines ont été classées par l'IARC dans le groupe 1 « produit cancérogène pour l'homme » en raison des différentes études épidémiologiques réalisées chez l'homme en Ouganda, au Swaziland, en Thaïlande, au Kenya, au Mozambique, en Chine, aux Etats-Unis et aux Philippines (IARC, 1987).

Une autre étude (IARC, 1993b), a confirmé le classement des aflatoxines. L'AFM1 est classée dans le groupe "2B", considérée comme cancérogène possible pour l'homme (IARC, 1993b).

L'exposition chronique aux aflatoxines (AF) est responsable de cancers chez diverses espèces animales. Non seulement, l'AFB<sub>1</sub> mais également les autres aflatoxines (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) induisent des tumeurs hépatiques aussi bien chez la souris que le rat, chez le canard, la truite, le saumon et le singe (Castegnaro, 1999 ; IARC, 1993 ; IARC, 2002 ; Pfohl-Leszkowicz, 2009).

En général, il s'agit de cancer primaire du foie, néanmoins des tumeurs des reins, de la vésicule biliaire, du pancréas, de la vessie peuvent avoir lieu ainsi que des leucémies. La fréquence de tumeurs rénales et d'adénome du colon, est augmentée en cas de déficience en vitamine A. Le pouvoir cancérogène des AF dépend de leur structure chimique. Ainsi l'AFB<sub>1</sub> est le plus puissant cancérogène hépatique, alors que l'AFG<sub>1</sub> induit plutôt des tumeurs rénales. Les cancers primaires du foie sont caractérisés par des carcinomes hépatocellulaires, des cholangiosarcomes et des hépatoblastomes. L'aflatoxine a un effet co-carcinogène avec le virus de l'hépatite B sévissant souvent dans les mêmes zones.

### 6.4.2 Génotoxicité et mutagénicité.

L'interaction ADN-toxine est le point clef dans le développement du processus de cancérogenèse. Il a été clairement démontré, lors d'études expérimentales chez l'animal, que les aflatoxines se fixent sur l'ADN et sur les protéines. L'AFB<sub>1</sub> après avoir été métabolisée en aflatoxine B<sub>1</sub>-8,9-époxyde va réagir avec la guanine au niveau de l'azote en position N 7 pour donner le trans-8,9-dihydro-8 (7-guanyl)-9-hydroxy-aflatoxine B<sub>1</sub> (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Le dosage de cet adduit dans les urines constitue une méthode de détection d'une exposition récente à cette substance. Les aflatoxines sont mutagènes dans tous les tests.

### 6.4.3 Tératogénicité

Les aflatoxines sont tératogènes pour le hamster, le rat. L'administration d'une dose unique d'aflatoxines provoque des malformations, voire des avortements. Arora *et al.* (1981) relatent que chez les souris CBA gestante, l'administration d'une dose unique d'AFB<sub>1</sub> par voie intra-péritonéale provoque des anomalies fœtales (exencéphalie saillie de l'intestin), uniquement lorsque l'exposition a lieu le 8<sup>ème</sup> jour de gestation mais pas au jour suivant.

Des souris gestantes ont été exposées à de l'AFB<sub>1</sub> et ou de l'AFG<sub>1</sub> quotidiennement (0,8ng AFB<sub>1</sub>/kg de poids corporel (pc) ou 4,8 ng d'AFG<sub>1</sub>/kg de pc). Les petits de ces souris ont été élevés jusqu'à 6 mois, puis sacrifiés en même temps que leur mère. L'AFB<sub>1</sub> provoque l'accumulation de graisse et d'acide gras dans le foie et est cytotoxique pour le foie et le rein (Ankrah *et al.*, 1993).

L'AFB<sub>1</sub> s'accumule chez le fœtus au niveau des pigments cutanés et au niveau de la muqueuse nasale, lors d'une administration en fin de gestation.

L'effet tératogène est observé aussi chez les embryons de poulet pour lesquels on note un retard de croissance, une ex-encéphalie, une microcéphalie, une anophtalmie, un palais fendu (bec de lièvre) et une déformation des maxillaires (Vesley *et al.*, 1983).

## 6.5 Effets des aflatoxines sur les animaux

### 6.4.1 Bovins

Les veaux sont sensibles aux aflatoxines (Vaid *et al.*, 1981 ; Colvin *et al.*, 1984). Des lésions hépatiques, correspondant à une cirrhose avec formation d'ascite et gonflement des viscères, sont observées chez des veaux ayant ingéré pendant 4 mois des nourritures contenant 2 mg/kg d'AFB<sub>1</sub> (Allcroft & Lewis, 1963).



Lynch *et al.* (1970) décrivent des hyperplasies hépatiques dès la fin du premier mois, puis amplification des symptômes le deuxième mois pour aboutir à une dégénérescence au troisième mois. Au quatrième mois, il y a prolifération des canalicules biliaires et occlusion de la veine porte. L'ingestion de 1,8 mg/kg pc d'AFB<sub>1</sub> par des veaux de 44 kg provoque la mort (Lynch *et al.*, 1972). Helferich *et al.* (1986 a) observent une diminution de poids chez des veaux de 250 kg ayant ingéré quotidiennement 600 ppb d'AFB<sub>1</sub> pendant 155 jours. Par contre, une alimentation contaminée par 300 ppb d'AFB<sub>1</sub> et ingérée par des veaux pendant plusieurs semaines ne provoque pas d'effets (Patterson & Anderson, 1982). Une dose de 0,2 ppm d'AFB<sub>1</sub> provoque une réduction du gain de poids chez les veaux (Pier, 1992). Un effet toxique sur le foie est observé chez les bovins exposés à 100 µg/kg d'aliment complet (Garret *et al.*, 1968).

L'exposition des bovins laitiers à du maïs contaminé à raison de 120 ppb AFB<sub>1</sub> conduit à des problèmes graves, dont une baisse de la reproduction de 2% pendant 5 mois après l'exposition et une baisse de production du lait de 28% (Guthrie, 1979 ; Corbett *et al.*, 1988) ainsi qu'une perte de poids et une atteinte hépatique (Bodine & Mertens, 1983). Il y a aussi naissance de veaux de petite taille et en mauvaise santé, diarrhées, mammite, perte d'appétit (Guthrie, 1979).

L'aflatoxine modifie la fonction du rumen conduisant à une baisse de la digestion de la cellulose et d'acides gras volatils (Cook *et al.*, 1986). L'ingestion d'une dose unique de 0,5mg/kg pc bloque la motilité du rumen pendant 24h (Trucksess *et al.*, 1983).

Un autre volet de la contamination en aflatoxine B<sub>1</sub> du fourrage est la formation d'aflatoxine M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) qui est excrétée dans le lait. La quantité d'AFM<sub>1</sub> excrétée dans le lait varie entre 1-6% du taux AFB<sub>1</sub> de la ration (Van Egmond, 1989a ; Veldman *et al.*, 1992).

#### 6.4.2 Porcins

L'exposition chronique à des aliments contaminés à raison de 0,14 ppm en AFB<sub>1</sub> pendant la période de croissance des porcs (20 à 70 kg) conduit à une diminution du gain de poids (Duthie *et al.*, 1966). L'exposition de porc de 12 kg à une alimentation contenant les 4 aflatoxines (proportion 88% AFB<sub>1</sub> ; 9% AFB<sub>2</sub> ; 2% AFG<sub>1</sub> ; 1% AFG<sub>2</sub>) à raison de 1 ppm conduit au bout de 28 jours à une diminution de la prise alimentaire et du gain de poids, ainsi qu'atteinte hépatique (infiltration leucocyte, hyperplasie des canalicules biliaires ; cholestase...) (Harvey *et al.*, 1988).

#### 6.4.3 Volailles

Les aflatoxines ont été découvertes à l'occasion d'un épisode toxique dans les élevages de dindes en Angleterre en 1960. La cible principale des aflatoxines est le foie. Une hyperplasie avec fibrose et prolifération des canalicules biliaires sont observés chez le canard (0,1ppm) ; dinde (0,3-0,5 ppm) et le poulet (0,5-2ppm). Ceci s'accompagne d'altérations biochimiques et hématologiques (baisse du taux de protéines, cholestérol, triglycérides et augmentation gamma GT, phosphatase alcaline et transaminases dans le sang) (Hamilton, 1989). L'ingestion d'AFB pendant 12 semaines (0,25 à 2 ppm) entraîne la diminution de la production des œufs. A plus forte dose il y a perturbation de la formation de la coquille de l'œuf ; et les œufs sont tachetés de sang (Shirley & Tohala, 1983).

L'exposition chronique à faible dose peut aussi être problématique (diminution gain de poids, chute de ponte). Une analyse approfondie des données disponibles indiquent qu'un aliment contaminé à hauteur de 30µg/kg d'aliment entraîne une baisse de l'indice de conversion alimentaire et de la croissance dans 30% des cas. Une dose de 6µg/kg entraîne ces effets sur 2% des animaux (Hamilton, 1989).

Très récemment il a été montré qu'une contamination de l'aliment de poulet par 0,5 µg/kg AFB<sub>1</sub> ou 1µg d'*Aspergillus flavus* ou *parasiticus* pendant 4 semaines conduisaient dès 7 jours à une réduction des poids des animaux ainsi qu'à une baisse significative des globules rouges, de l'hémoglobine, des globules blancs accompagné d'une augmentation des lymphocytes et des éosinophiles (Jeff-Agboola *et al.*, 2011). L'aflatoxine peut se retrouver dans le foie des volailles. Lorsque les volailles sont exposées pendant 8 jours à 3 ppm, on retrouve environ 8 ppb d'AFB<sub>1</sub> et 5 ppb d'AFB<sub>1</sub> conjugué ainsi que 22 ppb de métabolites (AFQ, AFM, AFB<sub>2</sub>...) et 10 ppb de métabolites conjugués chez la caille. Dans les mêmes conditions on retrouve 10 fois moins de résidus dans le foie des canards et 50 fois

moins dans le foie du poulet (Bintvihok *et al.*, 2002). Le rapport entre aliment et résidus dans le foie est 383 chez la caille et égal ou supérieur à 5769 chez les autres volailles.

Le passage de l'AF dans les œufs est aussi observé (rapport aliment/œuf =4615) (Bintvihok *et al.*, 2002). Chez la poule pondeuse l'exposition pendant 4 semaines à 2,5 ppm se solde par la présence de 4-6 ppb dans le foie, pas de résidus dans les œufs mais par contre le poids des œufs diminue (Zaghini *et al.*, 2005). Les dindes ingérant pendant 11 semaines un aliment contenant 50 -150 ppb accumulent un peu de l'AFB<sub>1</sub> et AFM<sub>1</sub> dans le foie, le rein et le gésier (0,02-0,16 ppb) (Richard *et al.*, 1986).

L'AF ainsi que d'autres mycotoxines sont suspectées de provoquer une insuffisance en caroténoïdes chez les poulets (Tyczkowsk & Hamilton, 1987a ; Surai & Dvorska, 2005) en altérant l'absorption, le transport, la distribution et l'élimination des caroténoïdes avec pour conséquence une dérégulation de la biosynthèse des lipides (Riley *et al.*, 1998).

#### 6.4.4 Animaux de compagnie (chat et chien)

Les mycotoxines sont retrouvées dans les aliments pour animaux de compagnie. Beaucoup d'intoxication alimentaire chez les chiens ont été associées à la contamination par les aflatoxines.

Quand des ingrédients contaminés en AF & OTA sont utilisés dans la production d'aliments, les animaux ingérant ces aliments avariés peuvent développer des mycotoxicoses aiguës (Szczzech *et al.*, 1973 ; Kitchen *et al.*, 1977) .

L'anorexie et la dépression sont les deux symptômes les plus visibles de l'aflatoxicose chez les chiens, bien que des cas de morts subites soient aussi signalés. Les chiens sont généralement exposés aux aflatoxines de façon accidentelle par le biais de l'inclusion de la contamination du maïs dans les procédés de fabrication de l'alimentation animale (Bailey *et al.*, 1959 ; Stenske *et al.*, 2006). Parfois, la contamination par l'aflatoxine persiste plusieurs mois avant d'être diagnostiquée, ce qui affecte un grand nombre d'animaux. Les chiens exposés à 0,5-1 mg d'aflatoxine/kg de poids corporel (pc) meurent généralement en quelques jours, suite à des vomissements, une polydypsie (une soif excessive), polyurie et hépatite (Böhm *et al.*, 2005). Des chiens exposés à 0,05-0,3 mg d'aflatoxine/kg de nourriture plus de 6-8 semaines ont montré des signes d'anorexie, de léthargie, de jaunisse, une coagulation intra vasculaire disséminée puis la mort. (Böhm *et al.*, 2005).

La sensibilité des animaux de compagnie à l'aflatoxine B<sub>1</sub>, exprimée en DL<sub>50</sub>, varie considérablement : lapins (0,3 mg/kg de poids corporel (pc)), vison (0,5-0,6 mg/kg pc), chats (0,55mg/kg pc), chiens (1mg/kg pc), les cobayes (1,4-2 mg/kg pc) les souris (9 mg/kg pc) et les hamsters (10,2 mg/kg pc) (Chu *et al.*, 2002).

## 7. Le désoxynivalénol (DON)

### 7.1 Origine et structure du désoxynivalénol (DON)

Le DON est une mycotoxine de la famille des trichothécènes B, contaminant naturel des céréales et de leurs produits dérivés. Le DON a été isolé pour la première fois par une équipe japonaise à partir d'orge infectée par *Fusarium graminearum* (Morooka *et al.*, 1972 ; Kushiro, 2008). C'est à la suite de vomissements constatés chez des porcs ayant consommé du maïs contaminé par ce même champignon, que Vesonder *et al.* (1973) ont caractérisé le composé actif comme étant un trichothécène et lui ont donné le nom de « vomitoxine ».

Les trichothécènes sont une grande famille de mycotoxines (figure 15) composées de 4 groupes :

- Groupe A : constitué par les trichothécènes qui n'ont pas de fonction cétone en C8. Les plus importants sont la toxine T-2, la toxine HT-2 et le diacétoxyscirpénol (DAS).
- Groupe B : constitué par les trichothécènes ayant une fonction cétone en C8. Les plus importants sont le désoxynivalénol (DON) et ses formes acétylées, le nivalénol (NIV), et la fusarénone-X (FX).
- Groupe C : constitué par les trichothécènes ayant un époxyde supplémentaire en C7 comme la crotocine.
- Groupe D : constitué par les trichothécènes ayant un macrocycle entre C4 et C15. Les plus importants sont les verrucarines, les roridines et les satratoxines.

Les groupes A et B et notamment les toxines T-2, HT-2 et le DON sont les plus fréquents en termes de prévalence naturelle.

Le DON est un composé polaire organique, sesquiterpénique (15 atomes de carbone), possédant un squelette tricyclique, appelé tricothécane, formé d'un cyclopentane, d'un cyclohexane, d'un cycle à six chaînons oxygénés et de groupements méthyles. Il possède une double liaison en C9-10, une fonction cétone en C8 ainsi qu'un groupement époxyde en C12-13 caractéristique des 12,13 époxy-tricothécènes (Vidal, 1990). Comparé aux autres tricothécène B, Le DON présente un groupement hydroxyle (OH) en C3 et en C7 (figure 16). Les 3 groupes hydroxyle libres (-OH) sont associés à sa toxicité.

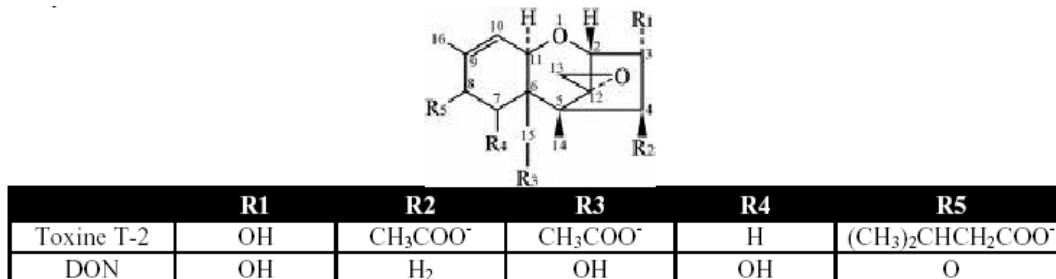


Figure 15 : Structure chimique des tricothécènes

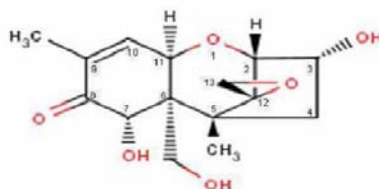


Figure 16 : Structure chimique du DON

Il n'est pas dégradé pendant les procédés de moutures de grains, de stérilisation du lait (15 minutes à 118°C) ou de cuisson des aliments. Le DON est stable à 120°C, modérément stable à 180°C et se décompose en 30-40 minutes à 210°C (Vidal, 1990 ; Hughes *et al.*, 1999). Le taux de DON est réduit dans les pâtes cuites et les nouilles, car il y a lixiviation du DON dans l'eau de cuisson (Manthey *et al.*, 2004 ; Sugita-Konishi *et al.*, 2006 ; Visconti *et al.*, 2004), Aucune réduction de la concentration en DON n'a été observée lors de la friture des aliments.

Le DON est produit par les champignons *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*, dont le développement est favorisé par certaines conditions de température et d'humidité. Lors d'une infection par *Fusarium* spp, le blé présente un aspect mou et ratatiné, souvent décoloré en rose. Sur les grains, le champignon est visible comme une moisissure rougeâtre sur la pointe de l'épi. Ces moisissures sont capables de résister à des conditions climatiques rigoureuses et leurs productions de toxines sont fortement stimulées par un passage à basse température ainsi qu'une grande humidité ambiante. Ces événements peuvent survenir en culture ou durant les récoltes, mais aussi lors d'un stockage en condition humide avant le séchage des grains (Pour un article général Sobrova *et al.*, 2010).

## 7.2 Exposition de l'homme

Parmi l'ensemble des mycotoxines produites par *Fusarium* spp, le DON est un des contaminants les plus fréquents du blé, de l'orge et du maïs et, selon un rapport de la FAO (Food Agricultural Organisation), le plus largement répandu à travers le monde dans les denrées alimentaires (JECFA, 2007). A titre d'exemple, aux Etats Unis, des analyses faites entre 1993 et 2003, sur 2106 lots d'orge et 2524 de blé, ont montré que 47,1% et 40,4% des lots d'orge et de blé, respectivement, présentaient une contamination en DON supérieure à 1000 µg/kg (ppb) de céréales. Une étude réalisée en Russie sur 2166 échantillons de céréales prélevés entre 1989 et 2001 a montré que 69% des lots étudiés étaient contaminés par du DON (Tutelyan, 2004). Une étude réunissant l'ensemble des résultats relatifs aux contaminations de plusieurs récoltes céréalières issues de 12 pays européens a montré que 57% de 11022 échantillons de céréales (blé, orge, maïs, avoine, seigle) étaient contaminés par le DON, dont 7% avec des concentrations supérieures à 750 ppb (SCOOP, 2003).

Le DON a été détecté également dans le sarrasin, le sorgho, le maïs soufflé et d'autres aliments pour alimentation humaine, comme la farine, le pain, les pâtes, la bière et le malt, bière (Pestka et Zhou, 2000). Il a été également retrouvé dans la bière, les œufs et le lait de vache (Schothorst et Jekel, 2003 ; Papadopoulou-Bouraoui *et al.*, 2004 ; Sypecka *et al.*, 2004 ; Keese *et al.*, 2008).

### 7.3 Toxicocinétique du DON

Le DON présente une biodisponibilité rapide chez les rongeurs. 37% d'une dose par voie orale de DON ont été retrouvés dans les urines de rat 24 heures après ingestion (Meky *et al.*, 2003). Chez la souris, les profils cinétiques de la distribution du DON dans le plasma, le rein et le foie sont semblables, avec une décroissance rapide suivie d'un palier à 24 heures (Azcona-Olivera *et al.*, 1995). Comme pour les autres trichothécènes, la métabolisation du DON met en jeu des réactions de déstérification, de dé-époxydation et de conjugaison. La dé-époxydation représente l'étape la plus importante dans la détoxification du DON, car privé de son époxyde, ce dernier n'est quasiment plus toxique. Après ingestion, le DON est dé-époxydé en DOM-1 (dé-époxydéoxynivalenol-1), par la flore intestinale et non par les microsomes hépatiques. Le DOM-1 est 50 fois moins toxique que la toxine d'origine (Worrell *et al.*, 1989; Eriksen *et al.*, 2003 ; Swanson *et al.*, 1988). Cette aptitude naturelle de la flore intestinale à dé-époxyder le DON comme d'autres trichothécènes B plus ou moins efficacement pourrait expliquer en partie les sensibilités différentes à ces toxines selon les espèces (Sundstol Eriksen *et al.*, 2004). En effet, le DON est peu métabolisé par la microflore intestinale du porc, qui est l'espèce animale la plus sensible à cette mycotoxine (Prelusky *et al.*, 1988).

### 7.4 Effets toxiques du DON

L'étude de l'impact des trichothécènes sur le système immunitaire a fait l'objet de nombreux articles généraux (Rotter *et al.*, 1996 ; Pestka *et al.*, 2004 ; Pestka, 2008). Plusieurs cas de mycotoxicoses chez l'homme et des animaux d'élevage ont été attribués à la consommation de céréales contaminées par du DON au Japon (Morooka *et al.*, 1972). En Inde, le DON a également été mis en cause en tant qu'agent étiologique dans des intoxications chez des habitants de la vallée du Kashmir ayant consommé du pain fabriqué à partir de blé moisi (Bhat *et al.*, 1989). Les symptômes de la maladie sont des nausées, des douleurs gastriques, des vomissements et des irritations au niveau de la gorge. L'ingestion de céréales contaminées par le DON a été associée à des intoxications sévères dans diverses parties du monde (Bhat *et al.*, 1989 ; WHO, 1990).

Le DON module l'activité des transporteurs intestinaux. Il affecte l'absorption des nutriments dans les cellules intestinales épithéliales humaines. L'inhibition de la synthèse protéique et l'induction de l'apoptose sont les principaux mécanismes de la toxicité de DON dans les cellules intestinales humaines (Maresca *et al.*, 2002).

#### 7.4.1 Cancérogénicité

Le DON a été placé par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (CIRC) en 1993 dans le groupe 3, c'est-à-dire ne présentant pas suffisamment de preuves expérimentales ou épidémiologiques pour apprécier sa carcinogénicité. Une étude de cancérogénicité chez les souris n'a montré aucune augmentation des incidences de cancers. Chez les males, il y avait même une diminution de l'incidence des néoplasmes du foie (Iverson *et al.*, 1995).

#### 7.4.2 Génotoxicité et mutagénicité

Le DON ne provoque pas d'augmentation de la fréquence des mutations chez les bactéries ou dans les cultures cellulaires mais a un effet clastogène (Knasmüller *et al.*, 1997) ; aussi bien dans les cellules de hamster chinois (Hsia *et al.*, 2004) que dans les cellules Vero ® (cellules rénales de singe vert (Sun *et al.*, 2002). L'exposition des cellules humaines de l'intestin (Caco-2) augmente de manière dose-dépendante (0,01-0,05 µM) la formation de comètes (Bony *et al.*, 2007).

### 7.4.3 Tératogénicité

Chez le rat, l'administration de 20 ppm de DON aux mâles et femelles Sprague-Dawley de 60 et 15 jours respectivement, n'a montré aucune altération particulière des organes génitaux mais une baisse de fertilité. Seulement 50% des accouplements entre les rats du groupe nourri avec le DON ont abouti à une grossesse, contre 80% dans les groupes témoins (Morrissey & Vesonder, 1985). Des souris femelles NMRI âgées de 3 mois, ont reçu une injection intra-péritonéale de DON (3,3 ; 4,2 ; 5 ou 10 mg/kg) aux jours de gestation 7 et 9 ou 1,6 ; 2,5 ; ou 3 mg/kg quotidiennement au 7-10<sup>ème</sup> jour de gestation. Les 2 doses les plus élevées en DON ont provoqué la mortalité maternelle. Les effets tératogènes observés sont au niveau cérébral : l'exencéphalie (absence de voûte crânienne), défaut de formation du tube neural. Des anomalies squelettiques ont également été observées (Debouck *et al.*, 2001).

## 7.5 Effets du DON sur les animaux

### 7.5.1 Porcins

Chez les animaux, les mycotoxicoses associées au DON sont principalement décrites chez le porc, les autres animaux étant beaucoup moins sensibles à son ingestion. Les principaux symptômes sont liés à un refus alimentaire et à des vomissements. La microflore de son tube digestif ne possède pas toujours la capacité de détoxifier la molécule (Eriksen *et al.*, 2003). La dose minimale qui par voie orale entraîne un effet émétique est de l'ordre de 50 à 200 µg/kg de poids corporel (Pestka *et al.*, 1987b ; Larsen *et al.*, 2004 ; Schlatter, 2004). Le plus souvent, ces effets sont temporaires et cessent avec l'exposition (He *et al.*, 1993 ; Eriksen & Pettersson, 2004). Eriksen et Pettersson (2004) préconisent une dose limite pour le porc de 0,3 mg de DON/kg d'aliment.

Durant l'été 1986 en Argentine, des porcs nourris avec plus de 40% de blé, après une saison froide et humide, ont présenté un refus alimentaire sévère associé à une chute de croissance des animaux. Les analyses ont démontré la présence de nombreuses souches de *Fusarium* et de niveaux de contamination variable de DON (1-20 ppm) dans le blé. Une étude expérimentale a démontré le rôle du DON dans le refus de l'aliment, entraînant également une congestion de la muqueuse de l'estomac et de l'intestin grêle, une dégénérescence hydropique des hépatocytes et une vacuolisation des cellules du tubule contourné distal (Marpegan *et al.*, 1988).

### 7.5.2 Volailles

Les volailles sont moins sensibles. L'ingestion de nourriture contaminée par 8 ppm de DON, ne provoque aucun problème aux volailles. Lors d'un essai où des poules ont été nourries avec 82,7 ppm en DON pendant 27 jours, aucun effet n'a été observé, ni sur les performances zootechniques, ni sur l'apparition de lésions. Par contre l'exposition de poulets à de la nourriture contenant 1mg/kg de DON a montré une inhibition du transport du glucose et une diminution de la surface de la paroi intestinale (Awad *et al.*, 2011). Ce qui se solde par une malabsorption du glucose. Un faible taux de DON (2,6–17,9 ng/g) et de son métabolite déépoxy-DON (DOM-1 ; 2,4–23,7 ng/g) ont été retrouvés dans des œufs collectés en 2006 & 2007 chez des fermiers belges. L'ingéré calculé de DON sur la base de ces résultats contribue pour moins de 1% à la dose tolérable journalier de 1µg/kg pc établie par le JECFA (2007). Le DAS et la T-2 induisent des effets chez le poulet pour des doses de 1 ppm (Brake *et al.*, 1999 et 2000).

### 7.5.3 Bovins

Les ruminants sont quasiment insensibles aux trichothécènes puisque l'exposition pendant 6 semaines de 6,4 ppm de DON (Trenholm *et al.*, 1985) ou 66 ppm pendant 5 jours (Côté *et al.*, 1986) n'entraînent aucun effet, ni sur le gain de poids, ni sur la prise alimentaire ou la production de lait.

## 8. La multi-contamination par mycotoxines

L'exposition aux mycotoxines par la chaîne alimentaire s'effectue soit par consommation directe des matières premières (arachides, pistaches, amandes, fruits secs...) soit indirectement par ingestion des produits dérivés (par ex. produits issus de la panification, céréales pour le petit-déjeuner). Les procédés de conservation (stérilisation, pasteurisation, lyophilisation, congélation...), s'ils agissent sur les moisissures, ne permettent pas de détruire, ou très peu les mycotoxines (Bullerman & Bianchini, 2007).

La présence des mycotoxines est différente selon les régions du globe, mais il s'agit d'un problème mondial de par les approvisionnements en matières premières et les échanges commerciaux. Les moisissures toxigènes peuvent se développer sous tous les climats, sur tous les supports solides ou liquides dès l'instant qu'il y a des éléments nutritifs, de l'humidité (activité en eau ( $A_w$ ) supérieure à 0,6), d'où la grande variété des substrats alimentaires pouvant être contaminés.

Les mycotoxines les plus répandues dans les denrées alimentaires ainsi que leurs champignons producteurs sont présentés sur la figure 17.

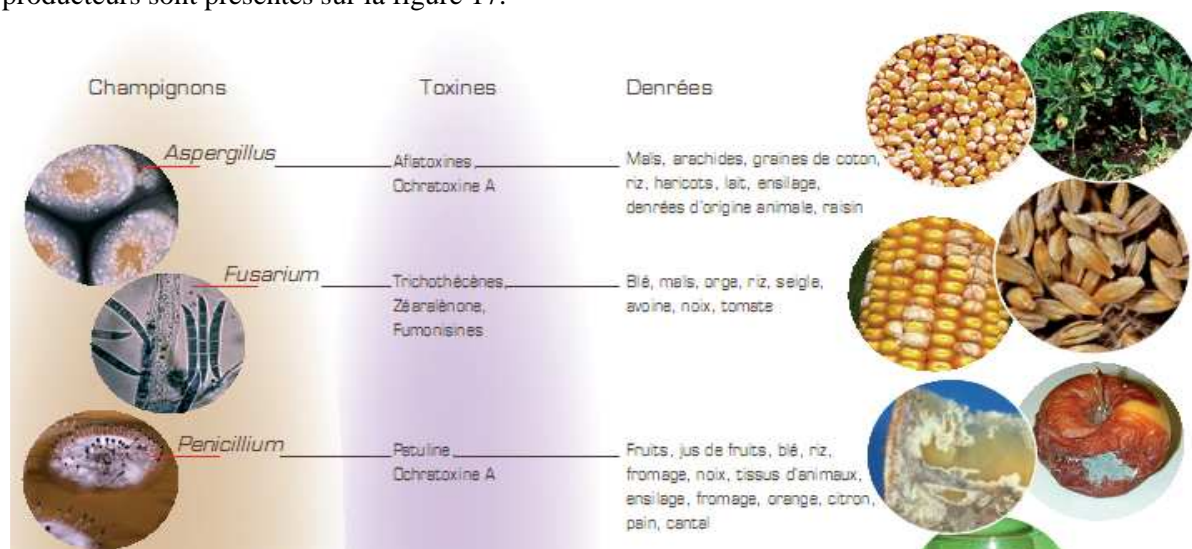


Figure 17 : Diversité des mycotoxines (site internet de l'INRA)

### 8.1 Facteurs influençant la production des mycotoxines

#### 8.1.1 OTA

La formation d'OTA dépend du pouvoir toxigène de la souche de moisissure, du type de substrat et de la localisation géographique. Les conditions de production de l'OTA sont propres à chaque moisissure et leurs maîtrises passent essentiellement par les bonnes pratiques de séchage et de stockage des grains et des fruits au sec. Cette toxine existe surtout en Europe et dans les régions à température modérée. Dans les régions tempérées, l'OTA est plutôt produite par des *Penicillia*, alors que dans les régions chaudes, ce sont plutôt les *Aspergillii* qui la synthétisent.

En Europe et au Canada, *P. verrucosum* est considérée comme la principale moisissure productrice d'OTA dans les céréales (JEFCA, 2002).

D'abord décrite comme métabolite d'*Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965a ; 1965b), il a été montré depuis que l'OTA pouvait être produite par d'autres espèces d'*Aspergillus*, en particulier *A. carbonarius*. *A. niger* produit également de faibles taux d'OTA. Il a été recherché les espèces d'*Aspergillus* présentes dans les aliments pour animaux (153 échantillons de céréales et légumineuses et 147 échantillons d'aliments composés). 94,4 % des échantillons de légumineuses et 89,9 % des aliments composés étaient contaminés par des *Aspergillii* contre seulement 53,3 % pour les céréales. *A. niger* représentait 23 % des espèces isolées et *A. ochraceus* 7,3 %. Seules 3 souches sur 52 d'*A. niger* et une souche sur 20 d'*A. ochraceus* étaient productrices d'OTA. Les souches de *Penicillium verrucosum* (anciennement nommé *P. viridicatum*) sont les plus productrices (Pour une revue générale voir rapport AFSSA, 2009).

*Aspergillus ochraceus* est décrit comme étant mésophile xérotolérant. Sa croissance est observée entre 8 et 37°C avec un optimum entre 24 et 31°C. Les conditions d'humidité les plus favorables sont toutefois de l'ordre d'une Aw de 0,5 à 0,95. *A. ochraceus* est retrouvé dans divers produits alimentaires d'origine végétale peu hydratés comme les produits secs (haricots secs, graines de soja, épices, olives, fruits secs, noix de pécan, pistaches, cacahuètes et noisettes) et dans les céréales (riz, avoine, maïs). *A. ochraceus* a aussi été retrouvé dans des produits d'origine animale comme des fromages, salaisons, poissons ou viandes séchés.

La croissance d'*A. carbonarius* est négligeable à 10°C quelle que soit le taux d'humidité. La croissance optimale est obtenue à des températures comprises entre 25 et 35°C. La température optimale de production d'OTA est de 15°C alors qu'à la température optimale de croissance du champignon peu d'OTA est produite. L'Aw optimale pour la production d'OTA est comprise entre 0,93 et 0,98 (Rapport AFSSA, 2009).

*Penicillium verrucosum* croît lentement pour une faible activité en eau (Aw inférieur à 0,80) et à basse température, entre 0 et 31°C avec un optimum à 20 °C, ce qui explique une distribution confinée aux zones tempérées ou froides. Les supports potentiels de développement de *P. verrucosum* sont les céréales en Europe Centrale, du Nord et au Canada. Cette moisissure est pratiquement inconnue dans les régions chaudes. La contamination est plus importante dans les pays d'Europe centrale, comme la Bulgarie (Petkova *et al.*, 1991).

### 8.1.2 CIT

Une étude permet de mettre en évidence l'influence de l'activité en eau (Aw) sur la croissance de *Penicillium citrinum* et l'accumulation de citrinine dans le blé. La citrinine n'est pas détectée pour une Aw inférieure à 0,8. En revanche, quand l'aw augmente la citrinine est produite plus précocement et à des teneurs plus élevées (on passe d'un niveau de production de 65 µg/kg pour une Aw de 0,81 à 22 mg/kg pour une Aw de 0,885) (Rapport AFSSA, 2009).

### 8.1.3 AF

Les conditions les plus favorables pour un développement d'*A. flavus* et une production d'aflatoxines sont une activité en eau (Aw) de 0,84-0,86 et une température comprise entre 25 et 40°C. Ces proliférations fongiques et les productions d'aflatoxine ont lieu au champ et au cours du stockage. Au champ, les insectes attaquent la surface des grains facilitant l'accès de la moisissure aux structures internes qui contiennent les nutriments et augmente le risque de contamination de la partie comestible. Un tel scénario ne concerne pas seulement les zones tropicales et les cultures d'arachide mais aussi les zones tempérées et certaines cultures comme le maïs, lors de saisons particulièrement chaudes et sèches. Un maïs récolté en 2003 (été caniculaire) dans un pays d'Europe méridionale, a présenté une contamination par l'AFB, inhabituelle sous cette latitude et révélée par la présence d'AFM<sub>1</sub> dans le lait de vache. Un tel cas (mêmes céréale et pays) s'est reproduit en 2005. Une enquête réalisée aux Etats-Unis en 1988, qui était également une année inhabituellement chaude et sèche dans la zone septentrionale (7 états du Middle West), a montré que 8% des maïs récoltés dans cette zone contenaient des aflatoxines (Rapport AFSSA, 2009).

### 8.1.4 DON

Le premier facteur de risque de production de fusariotoxines, notamment de DON dans le blé tendre (*Triticum aestivum*) et les céréales, est la pluie au moment de la floraison, voire dans les semaines qui suivent la floraison. (Rapport AFSSA 2009).

Le DON est un des contaminants les plus fréquents du blé, de l'orge et du maïs et, selon un rapport de la FAO (Food Agricultural Organisation). Il est largement répandu à travers le monde dans les denrées alimentaires (JECFA, 2007).

### 8.1.5 ZEA

La ZEA est produite par les champignons toxinogènes en même temps que d'autres toxines, notamment les trichothécènes, au cours de la maturation des grains de céréales lorsque les conditions climatiques sont mauvaises (exposition des épis aux intempéries) dans les régions tempérées d'Europe, d'Amérique et d'Asie (Rapport AFSSA, 2009).

### 8.1.6 FB

Les fumonisines des céréales semblent être produites quasi exclusivement au champ, sur maïs et sorgho par des espèces de *F. verticillioides* (anciennement *F. moniliforme*) et *F. proliferatum*. Les facteurs de variation sont moins bien connus que ceux concernant les autres fusariotoxines.

La présence importante de fumonisines est liée à des températures estivales élevées, comme on a pu le constater en France certaines années : ainsi, les maïs cultivés dans la partie septentrionale sont peu ou pas concernés par les fumonisines, alors que ceux cultivés dans la partie méridionale peuvent l'être. Les maïs cultivés en Europe du Sud seraient particulièrement exposés à la contamination par les fumonisines (Rapport AFSSA, 2009).

## 8.2 La présence de plusieurs mycotoxines dans les aliments

La multi-contamination de denrées par les mycotoxines est fréquente (multi-production de différentes mycotoxines par une même espèce ou production d'une seule mycotoxine par plusieurs espèces de moisissures simultanément). Il est donc fréquent de trouver plusieurs mycotoxines sur un même aliment, en particulier sur les céréales, vecteurs de mycotoxines très importants (voir tableau 4). Les mycotoxines étant peu métabolisées par les organismes vivants, elles peuvent également se retrouver dans les produits d'origine animale (lait ou produits laitiers, charcuterie...). L'AFM<sub>1</sub>, métabolite de l'AFB<sub>1</sub> se retrouve dans le lait de vache (Zinedine *et al.*, 2006b).

Tableau 4 : Principaux champignons, mycotoxines et denrées associées (adapté de l'AFSSA, 2009)

Produits infectés	AFB1	OTA	FB1	ZEA	DON
<u>Céréales :</u>					
Avoine	*				*
Blé	*	+		*	*
Orge	*	+		*	*
Maïs	*	*	*	*	*
Riz	*	*	*	*	*
Seigle	*	+			*
Sorgho	*		*		*
Produits dérivés	*	*	*	*	*
<u>Autres produits agricoles :</u>					
Cacao	*	*			
Café	*	*			
Bière	*	*	*	*	*
Vin		*			
Fruits séchés	*	*		*	
Fruits secs	*	*			
<u>Produits animaux :</u>					
Viande		+		*	
Lait	*	+		*	
Œuf				*	



Il existe plusieurs combinaisons de mycotoxines, les plus fréquemment rencontrés dans les produits végétaux sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : les combinaisons de mycotoxines les plus fréquemment rencontrés dans les végétaux. (Adaptés de Speijers *et al.*, 2004)

Mycotoxines	Références
Ochratoxine et citrinine	Pohland <i>et al.</i> , 1992; Vrabcheva <i>et al.</i> , 2000
Ochratoxine et zéaralenone	Halabi <i>et al.</i> , 1998
Ochratoxine et acide pénicillique	Stoev <i>et al.</i> , 2001
Ochratoxine et aflatoxines B <sub>1</sub>	Sedmikova <i>et al.</i> , 2001
Ochratoxine A et fumonisine	Domijan <i>et al.</i> , 2005
Patuline et Citrinine	Martins <i>et al.</i> , 2002
Fumonisine B <sub>1</sub> et moniliformine	Gutema <i>et al.</i> , 2000
Aflatoxine B <sub>1</sub> , fumonisine B <sub>1</sub> , zéaralenone, désoxynivalenol, nivalénol	Sardjono <i>et al.</i> , 1998; Eskola <i>et al.</i> , 2001; Gonzalez <i>et al.</i> , 1999
Désoxynivalenol, nivalénol, diacetoxy-scirpenol, T-2, HT-2, et autres trichothecenes	Eskola <i>et al.</i> , 2001; Pronk <i>et al.</i> , 2002

Certaines mycotoxines entraînent une toxicité aiguë très marquée (exposition unique à une dose mortelle). Toutefois, en Europe, ce type d'exposition est exceptionnel. L'exposition répétée à de faibles doses (effets chroniques), est la plus redoutée en raison des habitudes alimentaires ainsi que du pouvoir de rémanence de ces toxines.

### 8.3 Effets de la multi-contamination par les mycotoxines

L'effet de chaque mycotoxine prise individuellement est largement étudié. Cependant, l'effet de la multi-contamination est encore mal connu. L'effet toxique de chaque mycotoxine sur le porc est résumé dans le tableau 6.

Tableau 6 : Les effets toxiques des mycotoxines sur le porc

Symptômes	Mycotoxines du champ			Mycotoxines de stockage	
	FB1	ZEA	DON	AFB1	OTA
Atteinte des performances (croissance, anorexie)	+		+++	++	+
Atteintes hépatiques	++			+++	+
Atteintes rénales	+				+++
Trouble de la reproduction (avortement, infertilité)	+	+++			++
Œdème pulmonaire	+++				
Atteintes du système immunitaire	+++	+	++	+++	+

Ces dernières années, certains auteurs ont étudié l'effet combiné de certaines mycotoxines (Speijers *et al.*, 2004), notamment l'effet combiné de l'AFB et de l'OTA (Verma *et al.*, 2002 et 2007; Sandhu *et al.*, 1995; El Golli-Bennour *et al.*, 2010; Imperato *et al.*, 2011); de l'AFB et de la FB (Ogido *et al.*, 2004; Bernabucci *et al.*, 2011; McKean *et al.*, 2006); de la FB et la ZEA et l'OTA (Domijan *et al.*, 2005), et de l'OTA et la CIT (Molinié, 2004; Tozlovanu, 2008; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2008).

#### 8.3.1 Etudes *in vivo*

Récemment, il a été confirmé que dans les familles souffrant de BEN, les aliments étaient plus fréquemment et fortement contaminés en OTA, mais aussi en citrinine que dans les familles non affectées (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002; 2007). De plus des adduits spécifiques liés à l'OTA et à la CIT sont observés dans les tumeurs (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007; Pfohl-Leszkowicz, 2009). La CIT modifie la distribution et l'élimination de l'OTA et augmente les effets toxiques (Molinié, 2004; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2008a).

Certains auteurs mettent en avant un effet synergique, d'autres un effet additif ou antagoniste selon la combinaison et selon les toxines étudiées. L'effet diffère aussi selon l'espèce animale et selon

l'organe (Speijers *et al.*, 2004). La combinaison entre l'OTA et la CIT entraîne une interaction additive chez les lapins blancs (Kumar *et al.*, 2007) ; et des effets synergiques (Pohland *et al.*, 1992).

Parmi les cas signalés, certains éleveurs australiens ont constaté un refus de s'alimenter chez des porcelets, une diminution de consommation alimentaire des porcs plus âgés accompagnée d'une apparition de vulves rouges et œdémateuses chez plusieurs truies de 30-50kg. Les recherches effectuées sur l'aliment ont révélé la présence de ZEA et de DON dans les céréales, conduisant à une double intoxication des animaux, la ZEA provoquant les symptômes d'oestrogénisme et le DON le refus de l'aliment (Moore *et al.*, 1985).

Les différentes combinaisons de trichothécènes montrent principalement des effets additifs, même si un antagonisme a été observé *in vivo* entre la toxine T-2 et le DON (Eriksen & Pettersson, 2004 ; Larsen *et al.*, 2004). Chez la poule, la combinaison de la toxine T-2 (2mg/kg d'aliment) et du DAS (2mg/kg d'aliment) pendant 24 jours montre des effets additifs sur la prise alimentaire et les lésions orales (Diaz *et al.*, 1994). De nombreuses études mettent aussi en évidence des interactions positives lorsque plusieurs fusariotoxines sont présentes dans des céréales ou des aliments, notamment sur le gain de poids. La combinaison de la FB<sub>1</sub> et de la moniliformine (100-200 mg/kg d'aliment) a une action supérieure chez le poulet que les molécules seules (Ledoux *et al.*, 2003).

La co-contamination ZEA-acide fusarique augmenterait leur taux de transfert dans le lait de rate de 2 et 5 fois chacun (Porter *et al.*, 1998). Les interactions peuvent varier selon les espèces. Alors que le DON et la FB<sub>1</sub> ont un effet synergique sur le poids chez le porc, cet effet s'avère additif chez les poussins (Harvey *et al.*, 1996 ; Kubena *et al.*, 1997a). Des essais montrent une synergie entre la FB<sub>1</sub> et l'AFB<sub>1</sub> sur la diminution de la croissance des agneaux (Harvey *et al.*, 1995a; 1995b).

La présence simultanée de mycotoxines ne conduit pas systématiquement à une aggravation des symptômes. Ainsi l'exposition à 0,35 ppm et 0,75 ppm (mg/kg d'aliment) d'AFB<sub>1</sub> avec respectivement 1 ppm et 2 ppm d'OTA chez des porcs, pendant quarante deux jours ne modifie pas la sévérité des lésions hépatiques qui sont similaires à celles décrites lors d'aflatoxicose alors que les lésions rénales sont moins sévères que celles observées chez les animaux exposés à l'OTA seule (altération dégénérative des tubules rénaux, fibrose corticale, augmentation des concentrations sériques de créatinine et d'urée) (Tapia & Seawright, 1985).

Harvey *et al.* (1989) ont observé un phénomène identique chez des porcs exposés à une association d'aflatoxine (2mg/kg, AFB<sub>1</sub> 79%, AFG<sub>1</sub> 16%, AFB<sub>2</sub> 4%, AFG<sub>2</sub> 1%) et l'OTA (2 mg/kg) pendant vingt huit jours. Ils ont observé une diminution de la sévérité des lésions rénales comparée aux animaux exposés à l'OTA seule. Ces deux études concluent à une interaction des aflatoxines et de l'OTA au niveau rénal qui tendrait à limiter le développement des lésions. Les auteurs proposent l'hypothèse d'une interférence de l'AFB<sub>1</sub> sur les sites de liaison de l'OTA. Par contre, il y aurait une absence d'interaction au niveau hépatique puisque les lésions sont similaires à celles développées lors d'une aflatoxicose simple (Harvey *et al.*, 1989).

A l'inverse l'exposition simultanée à l'aflatoxines (AFB<sub>1</sub> 79%, AFG<sub>1</sub> 16%, AFB<sub>2</sub> 4%, AFG<sub>2</sub> 1% : 2,5 mg/kg) et à la FB<sub>1</sub> (100 mg/kg) met en évidence une synergie d'action. Les animaux ont une prise alimentaire et un gain de poids significativement inférieurs à ceux observés après l'administration d'aflatoxines seules ainsi qu'une augmentation des phosphatases alcalines et transaminases (AST) plasmatiques (Harvey *et al.*, 1995b). D'autres études ont confirmé l'effet synergique de l'association de ces deux toxines sur la prise alimentaire (Harvey *et al.*, 1995 ; Dilkin *et al.*, 2003 ; Meissonnier *et al.*, 2005)

### 8.3.2 Etudes *in vitro*

La fragmentation de l'ADN des cellules intestinales humaines Caco-2 est d'autant plus importante lorsque la ZEA (10µM) est mélangée au DON (10µM) (Kouadio, 2007).

Dans la souche *Salmonella typhimurium* TA98, la combinaison de DON et d'AFB<sub>1</sub> est plus mutagène que l'AFB<sub>1</sub> seule (Tajima *et al.*, 2002).

Les mycotoxines masquées représentent un autre aspect de la complexité du problème posé par les mycotoxines. Ce sont tout d'abord des mycotoxines conjuguées, liées de manière covalente à une autre molécule polaire organique, pour former des glycosides ou glucuronides, et issues de la métabolisation de la mycotoxine au niveau des plantes. Les mycotoxines conjuguées restent cependant biologiquement actives puisqu'elles peuvent être libérées durant la digestion ou durant certains

procédés de transformation des aliments. Leur caractère masqué provient du fait que les mycotoxines conjuguées échappent à la détection durant les campagnes d'analyse et ne peuvent être extraites en utilisant les procédures analytiques de routine. Ce type de mécanisme est donc responsable de la minimisation de la teneur réelle en mycotoxines d'un aliment. D'où, dans des situations réelles, l'observation d'effets chroniques ou pathologiques non expliqués par le niveau de mycotoxines mesuré par les techniques de routine, minimisant la partie masquée des mycotoxines présentes dans l'aliment celles-ci pouvant constituer dans certains cas près de 50 % de la quantité totale des mycotoxines présentes (Yiannikouris, 2009).

A titre d'exemple, La zéaralène est produite dans le blé sous forme libre mais également sous forme du conjugué zéaralène-4- $\beta$ -D-glucoside (42% des échantillons positifs analysés) à des concentrations variant entre 17 et 104  $\mu\text{g/kg}$  pour des teneurs en zéaralène de 10 à 860  $\mu\text{g/kg}$ . Les métabolites naturels ( $\alpha$  et  $\beta$  zéaralénols) sont également présents dans les céréales contaminées (Rapport AFSSA, 2009).

D'autre part, les données de contamination sont souvent très disparates en raison des difficultés d'échantillonnage, et des difficultés de dosage. En effet, les mycotoxines sont souvent distribuées d'une manière très hétérogène dans les produits végétaux. La qualité de l'échantillonnage a une influence primordiale sur le résultat analytique.

## **Analyse bibliographique**

---

### **Partie 2**

### **Devenir des toxiques et apparition de cancer**

# 1. Métabolisation des xénobiotiques

## 1.1 Généralités

L'être humain tout comme les animaux sont soumis quotidiennement *via* l'air, l'eau ou la nourriture à des substances exogènes d'origines diverses, appelées xénobiotiques. Ces composés peuvent être des substances naturelles, des médicaments et des polluants de l'environnement: toxines végétales (mycotoxines ; alcaloïdes) et animales (venin), dérivés des combustibles domestiques et industriels, solvants, colorants, additifs alimentaires, pesticides, herbicides, etc...

Les principales voies de distribution, d'absorption et d'excrétion des molécules toxiques sont résumé dans la figure 18.

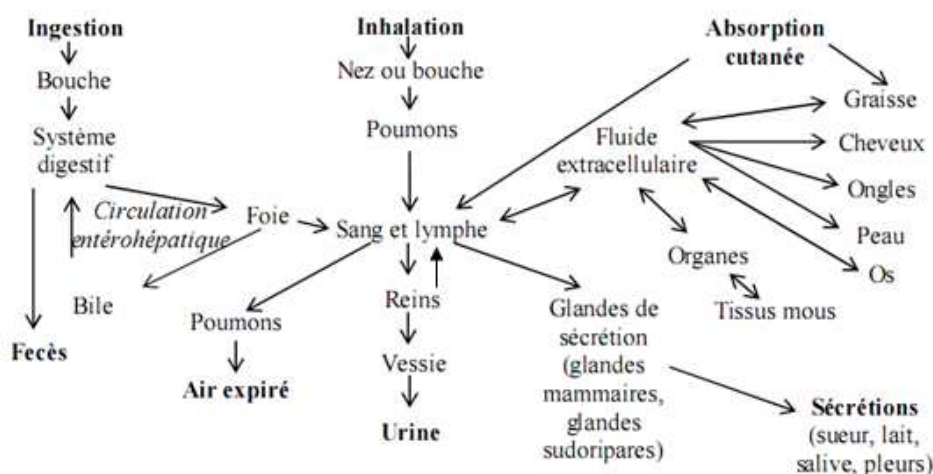


Figure 18 : Principales voies de distribution, d'absorption et d'excrétion des molécules toxiques (d'après Pussa, 2007)

Les molécules hydrophobes ont tendance à s'accumuler dans les lipides des membranes cellulaires. Leur élimination ne peut avoir lieu qu'après transformation en dérivés plus hydrophiles. Le processus se déroule selon trois phases regroupant différentes enzymes de biotransformation (phases I et II) présentés dans le tableau 7, et des transporteurs (phase III) (Pour une revue voir Pfohl-Leskowicz, 2008).

Les réactions de phase I, dites de fonctionnalisation, permettent la révélation d'une fonction chimique nouvelle (-OH, NH<sub>2</sub>, COOH) rendant la molécule plus polaire. Les plus fréquentes sont des réactions d'oxydation, mais peuvent également être des réactions d'hydrolyse, de réduction ou de déhalogénéation. Ces réactions sont essentiellement catalysées par les mono-oxygénases mixtes à cytochromes P450 (CYP), les peroxydases (cyclooxygénase COX ; lipooxygénase (LOX) ainsi que la quinone réductase (NQO).

Les réactions de phase II, dites de conjugaison, consistent en l'ajout d'un radical hydrophile soit directement sur le xénobiotique inchangé, soit sur les métabolites "fonctionnalisés" générés par la phase I. Ces réactions de conjugaison en augmentant l'hydrophilie de la molécule, facilitent son transport et son élimination par les voies rénale et biliaire. Les radicaux hydrophiles conjugués sont des petites molécules endogènes polaires telles que le glutathion, l'acide glucuronique, le sulfate, les groupements méthyle, acétyle, des acides aminés. Ces réactions de conjugaison sont catalysées par différentes transférases (glutathion-S-transférases (GST); UDP-glucuronosyl transférases ; sulfotransférases...).

Les enzymes de phase III permettent l'élimination des conjugués hydrophiles. Ce sont essentiellement des glycoprotéines membranaires permettant le transport actif des xénobiotiques et des conjugués de la phase II hors de la cellule (Silverman 1999). Ils participent à l'excrétion de ces molécules hors de l'organisme par la voie biliaire (Stieger & Meier, 1998).

Généralement, le produit de biotransformation, appelé métabolite, est un composé biologiquement inactif dont l'excrétion est favorisée au niveau rénal ou biliaire. Toutefois, le métabolisme des xénobiotiques ne conduit pas toujours à la détoxification de ces composés. Dans certains cas, le métabolite présente une très forte réactivité par attaque électrophile sur les macromolécules cellulaires nucléophiles environnantes (protéines, acides nucléiques). Les adduits sur l'ADN peuvent entraîner des mutations ponctuelles et initier le processus de cancérogenèse. La formation d'adduits aux protéines peut entraîner une nécrose tissulaire et des phénomènes d'allergies (Dansette *et al.*, 1998, Pfohl-Leszkowicz, 2008).

Tableau 7 : Principales réactions de biotransformation.

Réactions	Enzymes	Localisation	Substrats
<b>Réaction de phase I</b>			
<b>Oxydations</b>	Alcool déshydrogénases	Cytosol	Alcools
	Aldéhyde déshydrogénases	Cytosol	Aldéhydes
	Monoamine oxydases	Mitochondrie	Amines
	Flavine monooxygénases	Microsomes	Amines tertiaires
	Cytochromes P450	Microsomes	
<b>Réductions</b>	Cytochromes P450	Microsomes	
	Carbonyl réductases		Aldéhydes, Cétones
	Alcool déshydrogénases	Cytosol	Aldéhydes, Cétones
<b>Hydrolyses</b>	Estérases	Cytosol	Esters
		Microsomes, Mitochondrie	
<b>Peptidases</b>		Microsomes	
<b>Réaction de phase II</b>			
	Epoxyde hydrolase	Microsomes, Cytosol	Epoxydes
	UDP Glucuronyl-transférases	Microsomes	Phénols, thiols, amines, acides carboxyliques
	Gluthation-S- transférases	Microsomes	Electrophiles
	Sulfotransférases	Cytosol	Phénols, thiols, amines
	O-,N-, S-méthyl-transférases	Cytosol, microsomes	Phénols, Amines
	N-acétyl-transférases	Cytosol	Amines
	Aminoacyl-transférases	Microsomes	Acides Carboxyliques

## 1.2 Les peroxydases

Les prostaglandines H synthétases (PGHS) aussi appelées cyclooxygénases (COX) et les 5-, 12- et 15- lipoxygénases (LIPOX) sont les principales enzymes impliquées dans la cascade de l'acide arachidonique (AA) et sont largement retrouvées dans les tissus de mammifères (pour un article général voir Smith & Fitzpatrick, 1996).

Certains xénobiotiques peuvent être oxydés *in vitro* et *in vivo* par la cyclooxygénase (COX) à partir d'acide arachidonique (AA), de peroxydes d'hydrogène ou de peroxydes lipidiques. Les réactions de bioactivation *in vivo*, faisant intervenir les COX sont observés surtout dans les tissus où l'activité des CYP est faible, comme c'est le cas par exemple au niveau du rein ou des testicules (Degen, 1993).

Il existe deux isoformes de la COX :

- la COX 1 (ou PGHS-1) est exprimée constitutivement dans la plupart des tissus où elle participe au maintien de l'homéostasie cellulaire (Garavito & DeWitt, 1999).
- la COX2 (ou PGHS-2) n'est exprimée constitutivement que dans quelques tissus, notamment le cerveau, la prostate et le rein. Elle est inducible par les facteurs de croissance (comme le TGFβ), les lipopolysaccharides, les hormones et des cytokines (Otto & Smith, 1995 ; De Leval *et al.*, 2000). La surexpression de la COX2 semble être impliquée dans la formation de certains cancers comme celui du colon (Prescott & Fitzpatrick, 2000) ou des voies urinaires (Williams *et al.*, 1999 ; Khan *et al.*, 2000 ; Majima *et al.*, 2003). L'implication des COX2 dans le processus de cancérogenèse se ferait soit en réprimant la voie de l'apoptose conduisant à la mort cellulaire soit en participant, au travers de la production de prostaglandines, à la croissance et à la différenciation cellulaire (pour un article général voir Prescott *et al.*, 2000).

La bioactivation de xénobiotiques liée à l'activité peroxydase de la COX représente les cas les plus importants. Plusieurs amines aromatiques ou phénols tels que la benzidine, le 2-aminofluorène, les nitrofuranes (Rice *et al.*, 1985), le paracétamol (Potter & Hinson, 1987), les oestrogènes stéroïdiens (Degen *et al.*, 1982) et l'hydroquinone (métabolite du benzène) (Schlosser *et al.*, 1990) subissent une oxydation *in vitro* par l'apport d'un électron catalysé par la peroxydase. Ces molécules en servant de co-substrats réducteurs pour la réduction des PGG<sub>2</sub> en PGH<sub>2</sub>, sont co-oxydées par la COX en métabolites qui peuvent réagir avec des protéines et des acides nucléiques.

Les LIPOX possèdent, elles-aussi, une activité peroxydasique. Dans des cellules des glandes mammaires de rats, le cancérogène N-hydroxy-2-acétylamino-fluorène est cooxydé par la 12-LOX en deux cancérogènes beaucoup plus puissants : le 2-nitrosofluorène et le N-acétoxy 2-acétylamino-fluorène, *via* une forme radicalaire nitroxyle (Wong *et al.*, 1982). Liu et Massey (1992), ont également prouvé que l'aflatoxine B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), mycotoxine cancérogène, était activée en aflatoxine B<sub>1</sub>-8,9-époxyde, non seulement par la COX, mais aussi par les LIPOX de poumons et de reins. Ces travaux ont été confirmés par des études d'activation *in vitro* (Datta & Kulkarni, 1994). Les LIPOX peuvent utiliser le glutathion réduit (GSH) comme substrat pour leur activité co-oxydase et génèrent la formation de conjugués au glutathion avec des xénobiotiques (Kulkarni & Sajan, 1999).

Dans notre laboratoire, nous avons montré l'implication de ces deux types d'enzymes dans la formation d'adduits à l'ADN liés à une exposition à l'OTA (Pinelli *et al.*, 1999a ; Azémar, 2000 ; El Adlouni *et al.*, 2000 ; pour une revue voir Manderville & Pfohl-Leskowicz, 2008).

## 1.3 Les glutathion-S-transférases.

Les Glutathion S-transférases (GST<sub>s</sub>) représentent une famille enzymatique de phase II. Il existe au moins 20 isoenzymes des GST cytosoliques chez l'homme classées en 5 familles : GST alpha, mu, pi, sigma, et theta (Miller *et al.*, 1997). Il existe deux types de GST membranaires : les GST microsomales et les leucotriènes C<sub>4</sub> synthases (LTC<sub>4</sub>S) (Otieno *et al.*, 1997).

Les GST possèdent principalement deux activités détoxifiantes (Hayes & Pulford, 1995):

- Conjuguer des composés électrophiles endogènes et exogènes avec le glutathion réduit par formation d'un pont thioether. Les produits peuvent être excrétés dans la bile ou transportés

dans le rein où ils sont ensuite métabolisés en acide mercapturique (figure 19), puis excrétés dans l'urine.

- Protéger la cellule par leur activité peroxydasique, qui consiste à réduire les peroxydes organiques en composés moins réactifs (Ketterer *et al.*, 1990).

Elles métabolisent, entre autres, des cancérogènes, des polluants environnementaux, des médicaments chimiothérapeutiques, des produits provenant du stress oxydatif (Hayes & Pulford, 1995) et des substances endogènes comme le leucotriène A<sub>4</sub> et la prostaglandine H<sub>2</sub>.

La conjugaison au glutathion est un processus détoxifiant, mais dans certains cas la conjugaison au glutathion augmente la toxicité des xénobiotiques. Des procarcinogènes peuvent être activés par cette voie (Seidegård & Ekström, 1997 ; Monks *et al.*, 1990).

Quatre mécanismes sont à l'origine de cette toxification, entraînant la formation de :

- Dérivés conjugués au glutathion d'alcane halogénés, de thiocyanates et de nitrosoguanidine,
- Dérivés d'alcane dihalogénés qui forment des ions episulfonium électrophiles,
- Dérivés d'alcènes halogénés qui sont dégradés en métabolites toxiques par la bêta lyase dans le rein,
- Dérivés de quinones, quinone-imines ou isothiocyanates qui sont dégradés en métabolites toxiques par la gamma glutamyltranspeptidase dans le rein.

Il est important de noter que ces voies peuvent être très importantes dans la métabolisation de l'OTA qui est une molécule chlorée (Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2006 ; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007 ; Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2008 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002a ; Faucet-Marquis *et al.*, 2006).



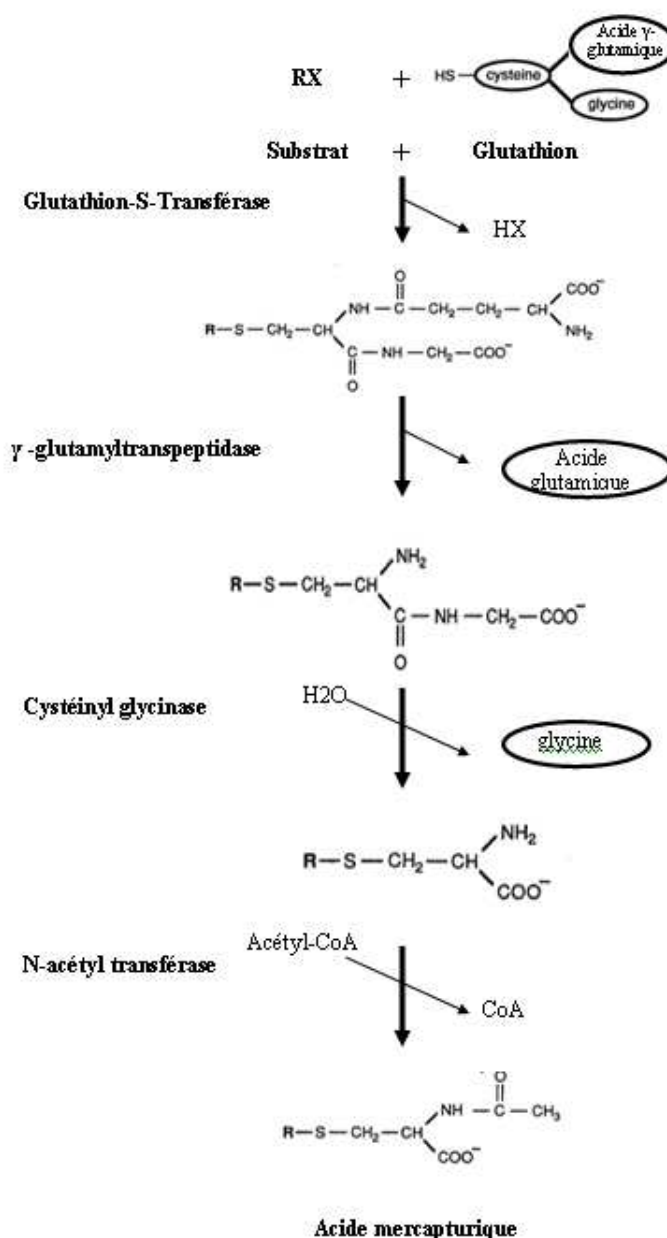


Figure 19 : Conjugaison au glutathion et biosynthèse d'acide mercapturique.

## 2. Cancérogenèse et adduits à l'ADN

### 2.1 Notions générales de cancérogenèse

L'induction de tumeurs est due à la conjonction de plusieurs facteurs et s'effectue en plusieurs étapes s'étendant sur plusieurs années de la vie d'un individu (figures 20 & 21). La phase d'initiation est due à une altération du matériel génétique de la cellule par fixation covalente de cancérogènes chimiques ou par modification de la structure de l'ADN (cassures, pontages inter et intra-brin). Cette phase d'initiation est un processus rapide entraînant un changement irréversible au niveau du matériel génétique de la cellule. Lorsqu'un xénobiotique pénètre dans l'organisme, il est soit directement éliminé par l'organisme, soit il est métabolisé. L'oxydation des substances par des monooxygénases à cytochrome P450 (CYP) ou autres enzymes de phase I comme les prostaglandines synthétases, résulte dans la majorité des cas à une détoxification du produit et une augmentation de son excrétion. Néanmoins dans certains cas la réaction d'oxydation conduit à la formation de métabolites très réactifs,

généralement nucléophiles et réagissant avec les sites électrophiles des macromolécules pour former des adduits en réalisant des liaisons covalentes avec les désoxyribonucléotides (figure 22). La fixation d'adduit n'est pas une lésion biologique mais biochimique qui a besoin d'être «fixée». Après deux ou trois réplifications cellulaires, une mutation stable peut être engendrée si la lésion promutagène de l'ADN n'est pas réparée ou l'est mal. L'ADN peut aussi être attaqué de manière indirecte, par action des espèces réactives de l'oxygène générées lors des processus de métabolisation ou attaque des lipides. On notera des cassures de l'ADN, des pontages inter et intra brin de l'ADN ou avec des protéines, des adduits exocycliques correspondant à la formation d'un cycle sur un nucléotide (éthenobases ou propanobase), des bases oxydées (8 hydroxy-guanine, 8 hydroxy-adénine, thymine glycol) (Møller *et al.*, 1998).

Pour maintenir la fidélité et l'intégrité de l'information génétique, les lésions provoquées par un cancérigène au niveau de l'ADN doivent être réparées. Les cellules de mammifères possèdent divers systèmes de réparation de l'ADN. Cette réparation fait intervenir en général quatre à cinq étapes différentes suivant le type de lésions induites et met en jeu diverses enzymes. Il existe quatre types de réparation : la réparation par excision de base (BER), la réparation par excision de nucléotides (NER), la réparation de mauvaises appariements (mismatch repair MMR) et la réparation directe (pour une revue générale voir Limp-Foster & Kelley, 2000). Si une mutation induite par les cancérigènes, suite à une mauvaise réparation, n'est pas létale quand la cellule se divise et l'ADN se réplique, la mutation ou l'erreur dans l'information génétique se transmettra au génome de la cellule fille. Ces mutations ou recombinaisons génétiques entraînent une modification de l'expression normalement programmée du génome humain de deux manières différentes soit (i) en activant par de simples mutations ponctuelles, un certain nombre d'oncogènes dont l'action est d'entraîner les cellules normales vers un phénotype malin, soit (ii) en réprimant des gènes suppresseurs de tumeurs dont l'action est de retarder ou d'inhiber la transformation. La formation d'une tumeur est le résultat d'un déséquilibre entre des facteurs stimulant la division cellulaire et des facteurs inhibant la division cellulaire (pour une revue voir Pfohl-Leskowicz, 1994 a, b; Pfohl-Leskowicz, 2008).

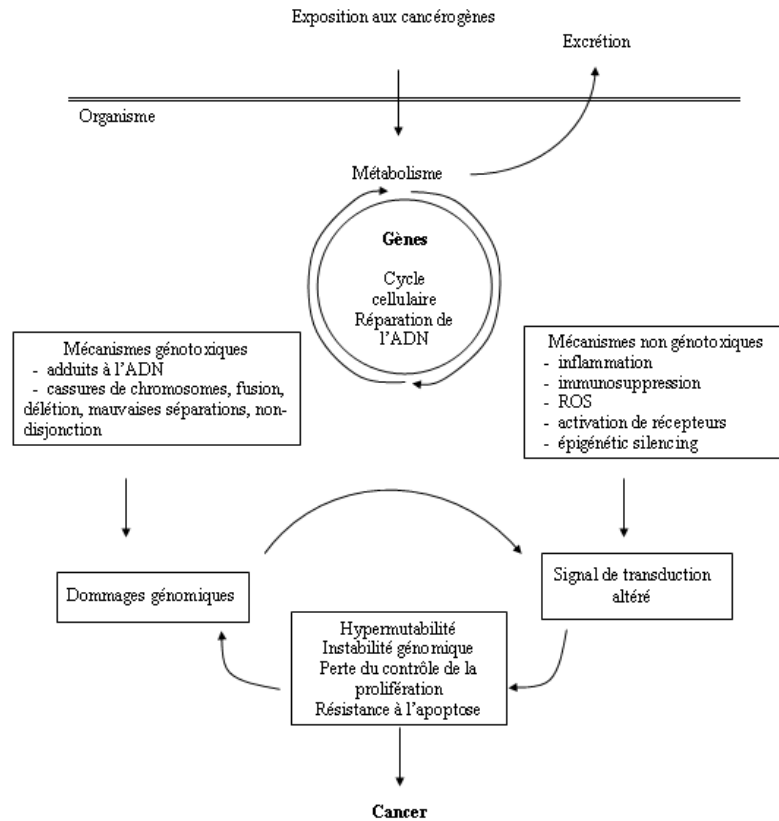


Figure 20 : Vue générale des différents modes d'action des cancérrogènes chimiques (d'après Luch, 2005 ; Faucet-Marquis, 2005).

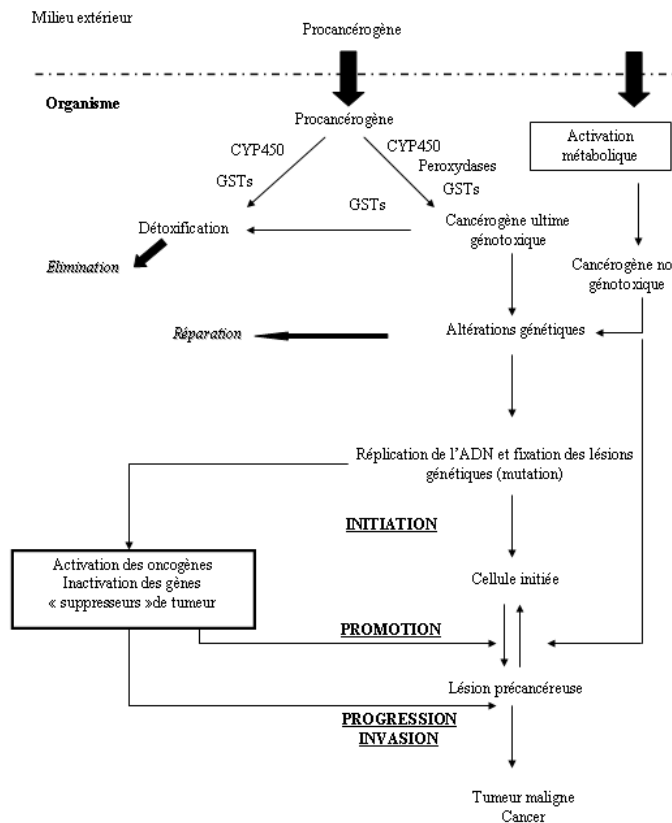


Figure 21 : Les principales étapes de la cancérogenèse chimique.

## 2.2 Les adduits à l'ADN comme marqueurs de la génotoxicité

La formation d'adduits à l'ADN est la résultante d'une séquence d'événements impliquant l'absorption de l'agent génotoxique, sa distribution dans les différents tissus, sa métabolisation pour former des intermédiaires réactifs, la liaison de ses métabolites ultimes à l'ADN et les systèmes de réparation de l'ADN.

Certains xénobiotiques ou leur métabolites sont capables de réaliser des liaisons covalentes à l'ADN, par l'intermédiaire d'une réaction de type électrophile/nucléophile, entraînant la formation d'un complexe appelé en anglais adduct (pour *addition product*) ce qui a été traduit en français par adduit (pour produits d'addition) à l'ADN. Cette lésion primaire de l'ADN est une étape importante dans les phénomènes d'initiation des cancers (Miller & Miller, 1981 ; pour une revue récente voir Pfohl-Leskowicz, 2008).

Parmi les sites nucléophiles, les atomes d'azote (N), d'oxygène (O) et de carbone (C), des bases pyrimidiques (thymine, cytosine) et puriques (adénine, guanine) de l'ADN, constituent les cibles privilégiées des composés génotoxiques. Ainsi au niveau des bases de l'ADN, il existe 18 sites potentiels impliqués dans la formation d'adduits (voir figure 22).

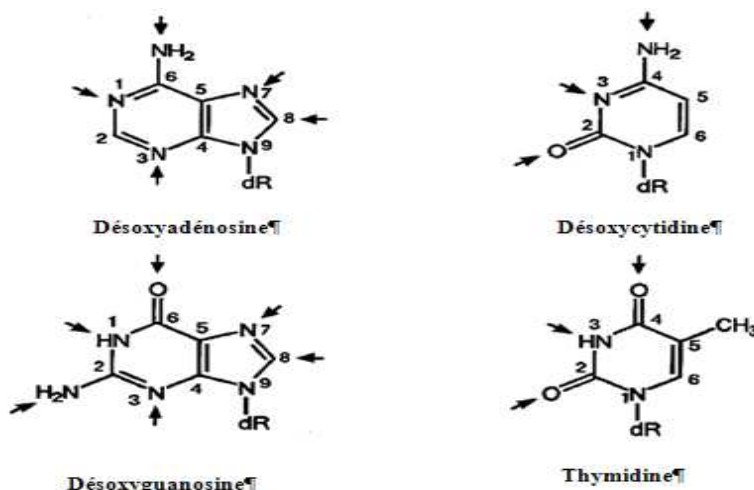


Figure 22 : Sites potentiels de la formation d'adduits à l'ADN.

La base préférentiellement (mais pas exclusivement) attaquée par les cancérogènes est la guanine: la position N7 est préférentiellement modifiée par les agents alkylants et l'aflatoxine B1, alors que les amines aromatiques se fixent plutôt sur les positions C8 et N2 (Heflich & Neft, 1994; Pfohl-Leskowicz, 1994 a & b) et les hydrocarbures polycycliques aromatiques sur la position N2 (Wang & Groopman, 1999; Hogan *et al.*, 1981 ; Alexandrov *et al.*, 1982).

## 2.3 Effets biologiques des adduits à l'ADN

### 2.3.1 Adduits stables et adduits dépurinants

Les cancérogènes chimiques se lient à l'ADN pour former deux types d'adduits:

- 1) les adduits stables qui restent fixés à l'ADN à moins d'être pris en charge par le système de réparation de l'ADN,
- 2) les adduits dépurinants qui sont relâchés de l'ADN par déstabilisation de la liaison glycosyl. Les adduits stables sont formés quand les cancérogènes réagissent en position N6 de l'adénine ou N2 de la guanine, tandis que les adduits dépurinants sont obtenus quand une liaison covalente est établie entre le cancérogène et les positions N3 ou N7 de l'adénine et N7 et parfois C8 de la guanine. La perte de l'adénine ou de la guanine par dépurination mène à la formation de sites apuriques ou abasiques qui peuvent générer des mutations menant à l'initiation de tumeurs.

Les sites abasiques formés sont réparés par le mécanisme de réparation par excision de bases (BER) au cours duquel peuvent se produire des erreurs. Les erreurs produites lors de la réparation de sites apuriniques peuvent conduire à l'initiation tumorale (Cavalieri *et al.*, 2002).

Lorsque la dépurination a lieu, la base purique adduitée peut être excrétée dans l'urine (Shuker & Farmer, 1992). Ce phénomène a été utilisé dans l'analyse des adduits guanine- aflatoxine B1 urinaires comme indicateurs des dommages à l'ADN (Qian *et al.*, 1994). Cependant, l'excrétion urinaire de tels adduits n'indique pas la source de la macromolécule endommagée (ADN ou ARN) ni le tissu où les adduits ont été formés.

Dans la majorité des cas, les lésions induites sur l'ADN vont être prises en charge par des systèmes enzymatiques visant à restaurer la séquence nucléotidique normale et maintenir ainsi l'intégrité de la cellule. La réparation de l'ADN consiste essentiellement en l'excision des résidus ou des groupes altérés de l'ADN. Les adduits à l'ADN peuvent être éliminés par trois types de mécanismes : la réparation par excision de bases (BER), la réparation par excision de nucléotides (NER) et la réparation de mauvais appariement (*mismatch repair* ou MMR).

Parfois les réparations ne sont pas correctes engendrant des erreurs à l'origine de mutations ponctuelles ou de réarrangement chromosomiques (Pfohl-Leszkowicz, 2008).

### **2.3.2 Formation d'adduits et cancérogenèse**

#### **2.3.2.1 Relations entre adduits et mutations**

Les premières preuves de la relation entre les adduits à l'ADN et la mutagenicité d'un cancérogène ont été apportées par Loveless, 1969. Cet auteur a montré que l'alkylation en O<sup>6</sup> du résidu guanine de l'ADN traité par des composés N-nitrosés induit des mutations par mauvais appariement de bases.

Différents adduits à l'ADN sont capables d'induire des mutations (pour un article général voir Hemminki, 2000 ; Vineis & Pererra, 2000). Par exemple, le benzopyrène diol époxyde (BDPE) dont le site préférentiel de fixation sont les sites GC, induit des transitions GC → TA (Jelinsky *et al.*, 1995). De même, l'aflatoxine B<sub>1</sub> induit des transitions GC → TA (Bailey *et al.*, 1996).

Shibutani (1994) a montré que des mutations spécifiques liées à certains adduits du N-acétyl-2 aminofluorène à grand potentiel de mauvais appariement, correspondent à une délétion d'une ou deux bases opposées à l'adduit. Néanmoins, l'établissement d'un lien entre un adduit spécifique et un type de mutation est souvent difficile, car un métabolite réactif peut interagir avec différents sites de l'ADN, et générer une grande variété d'adduits (Singer & Essigman, 1991 ; Hemminki *et al.*, 2000). En outre, différents facteurs peuvent affecter la possibilité d'un adduit d'induire une mutation tels que : l'orientation de l'adduit (c'est à dire de la base modifiée) par rapport à la base complémentaire, la nature de la polymérase, la séquence d'ADN dans laquelle est incluse l'adduit (Loechler, 1996 ; Kozack *et al.*, 2000).

### 2.3.2.2 Relation entre le développement tumoral et la formation d'adduits à l'ADN

Des études *in vivo* ont montré les relations qui peuvent exister entre les taux d'adduits à l'ADN et l'incidence de tumeurs (figure 23), en fonction de doses chroniques de composé cancérogène.

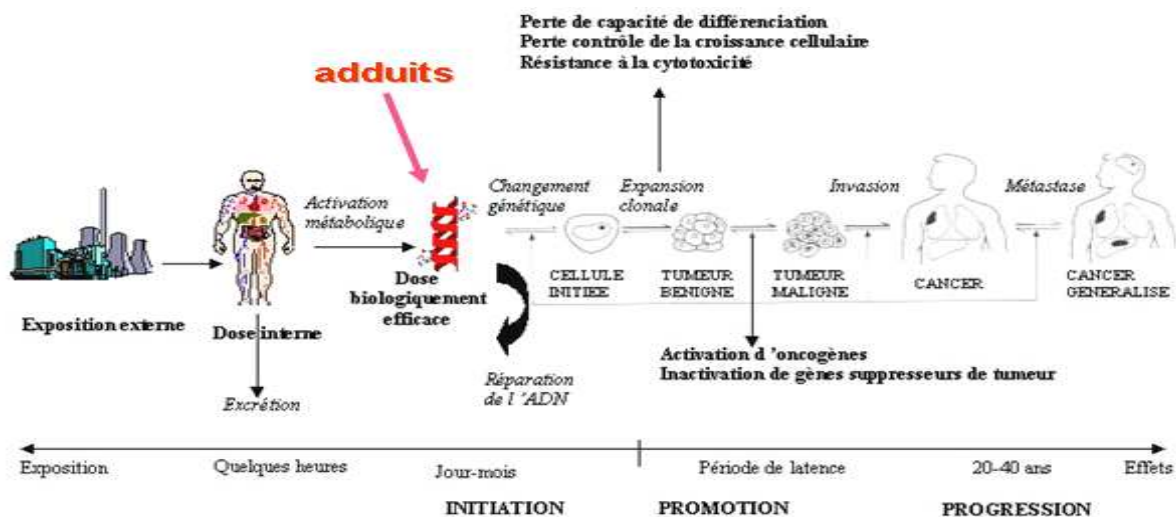


Figure 23 : Processus tumoral et les adduits (Pfohl-Leszkowicz, 2008)

Quatre types de diagrammes ont été ainsi définis (figure 24) qui correspondent à l'effet de différents cancérogènes [l'aflatoxine B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), 4-aminobiphényle (4-ABP), 2-acétylamino-fluorène (2-AAF), N, N-diéthyl-nitrosamine (DEN) et nitrosocétone dérivé de la nicotine (NNK)]. Ces composés ont été administrés de façon chronique, à différentes espèces de souris ou de rat mâles et femelles. Les effets ont été mesurés dans différents tissus (foie, poumon, vessie) (Poirier & Beland, 1992).

Dans les situations les plus simples, il existe une relation linéaire entre la dose de cancérogène, le taux d'adduits et la formation de tumeurs (figure 24 A). Ceci a été observé avec le 2-AAF dans le foie de souris femelle et avec l'AFB<sub>1</sub> dans le foie de rat mâle. Avec le 4-ABP, les taux d'adduits à l'ADN augmentent de manière linéaire, dans le foie de souris mâle, mais l'incidence des tumeurs n'atteint jamais 20 % même pour de fortes doses de cancérogène (figure 24 B). Donc, des voies de détoxification des métabolites réactifs ou des systèmes de réparation des adduits à l'ADN interviennent de façon efficace.

Le troisième cas de figure est le suivant : pour de faibles doses de cancérogène, il existe une relation linéaire entre le taux d'adduits à l'ADN et la tumorigénicité. Cependant, à des doses plus élevées de cancérogène, les taux d'adduits à l'ADN et la tumorigénicité n'augmentent plus proportionnellement à la dose de cancérogène et atteignent un plateau (figure 24 C). Les fortes doses de composé cancérogène peuvent induire une cytotoxicité et/ou une prolifération cellulaire qui inhibe alors la formation d'adduits à l'ADN et la tumorigénicité. Cette relation supralinéaire entre le niveau d'adduits à l'ADN et l'incidence des tumeurs en fonction de la dose de cancérogène a été observée avec le 4-ABP dans le foie de souris femelle, le DEN dans le foie de rat mâle et le NNK dans les poumons de rat mâle.

Dans le cas de la figure 24 D, la formation d'adduits à l'ADN est linéaire en fonction de la dose de cancérogène tandis que la tumorigénicité est sublinéaire puisqu'elle n'est significative que pour de fortes doses de cancérogène. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une forte cytotoxicité et a été observé avec le 2-AAF dans la vessie de souris femelle et le 4-ABP dans la vessie de souris mâle.

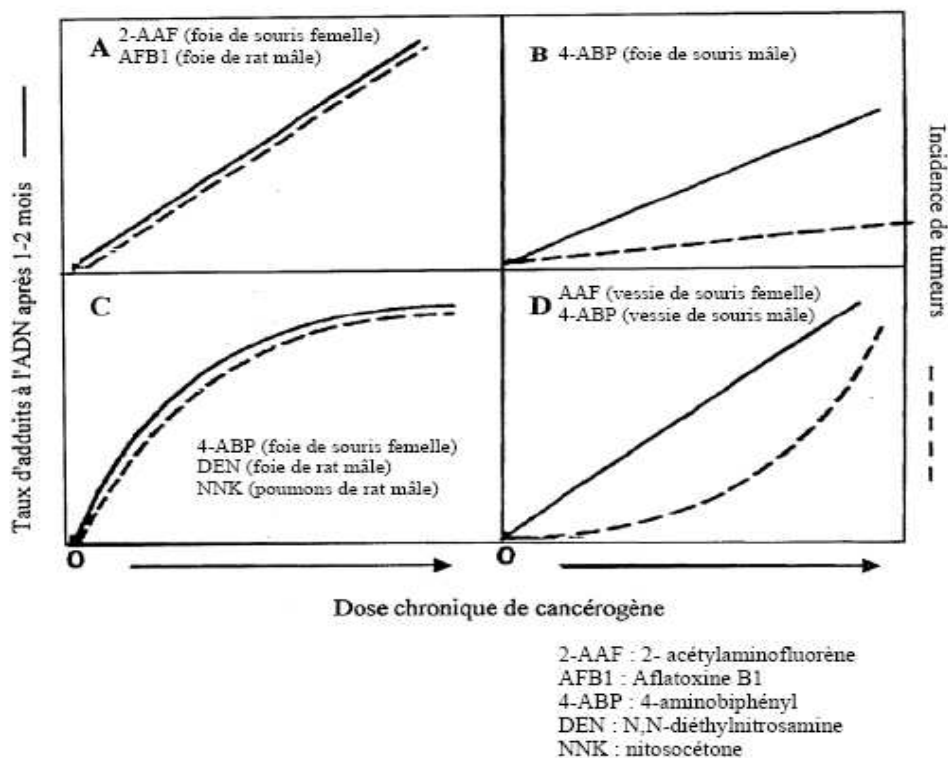


Figure 24 : Différentes possibilités de relations entre le taux d'adduits à l'ADN et l'incidence de tumeurs en fonction d'une dose chronique de cancérigène

### 2.3.3 Adduits comme marqueurs d'exposition

La formation des adduits à l'ADN est un événement primordial dans le processus de cancérogenèse. Il a été démontré pour plusieurs cancérigènes une meilleure corrélation du pouvoir cancérogène avec les adduits persistants (c'est à dire ceux qui sont réparés lentement) que ceux rapidement réparés. La détection des adduits à l'ADN est fréquemment utilisée comme biomarqueurs d'exposition à des composés électrophiles ou le devenant après métabolisation (Cui *et al.*, 1995; Decaprio *et al.*, 1997 ; Izzotti *et al.*, 1997 ; Singh *et al.*, 2006). Ceci présente un intérêt évident lorsque la nature de l'exposition et le temps d'exposition sont connus, par contre l'interprétation est beaucoup plus difficile dans les études épidémiologiques (D'arce *et al.*, 2000 ; Eder *et al.*, 1999 ; Farmer *et al.*, 1999 ; Talaska *et al.*, 2002 ; Tanningher *et al.*, 1997). Dans les études expérimentales, il a été montré que lors d'une intoxication constante un plateau dans la formation d'adduit à l'ADN était rapidement atteint. Plateau pour lequel le nombre de nouveau adduit formé par jour est équivalent au nombre d'adduit perdu par réparation. Si bien que si l'exposition dans les études épidémiologiques est constante, il peut raisonnablement être considéré que la quantité d'adduits mesurés correspond au plateau. Inversement si l'exposition est intermittente, inconnue et variable, la seule conclusion qui pourra être tirée est l'évidence qu'une exposition a eue lieu. A l'heure actuelle, de nombreux type d'adduits à l'ADN sont détectables. Le problème dans les études épidémiologiques est l'interprétation qu'on peut en faire (Farmer, 1999; 2004; Godschalk *et al.*, 2003 ; Hemminki *et al.*, 2000; Hurdey *et al.*, 1995; Sander *et al.*, 2005).

La présence d'adduits à l'ADN au niveau de l'ADN humain est une bonne indication d'une exposition passée de l'individu (Svenberg *et al.*, 2004). Les adduits à l'ADN au niveau de l'organe cible sont des biomarqueurs plus fiables que la mesure de la dose interne (métabolites dans les fluides biologiques) car les adduits sont non seulement le reflet de la variabilité individuelle d'absorption et de distribution, mais aussi la susceptibilité métabolique (toxification vs détoxification) et la capacité de réparation (Pfohl-Leszkowicz, 2008).

La mesure des adduits à l'ADN est un outil intéressant pour élucider le mécanisme de carcinogénicité et pour évaluer les effets des faibles doses. Souvent des plus faibles taux d'adduits

sont observés dans les parties tumorales en comparaison du tissu adjacent. Ceci peut être expliqué d'une part par le fait d'une prolifération cellulaire qui va entraîner une dilution des adduits, et d'autre part par la disparition des adduits suite à la réparation. Les adduits à l'ADN n'ont pas tous le même potentiel mutagène. Certains sont très mutagènes alors que d'autres ne provoquent par d'effet sur le patrimoine génétique (Hemminki *et al.*, 2004). Dans ce dernier cas, la détection de ce type d'adduits sera juste une mesure de l'exposition. La détection des adduits dans le tissu cible est non seulement un biomarqueur d'exposition, mais aussi un biomarqueur d'effet individuel (pour une revue voir (Otteneider *et al.*, 1999).

Dans la majorité des cas, les adduits à l'origine du déclenchement du processus de cancérogenèse ont disparu du tissu plusieurs années avant la découverte de la tumeur (Kryptopoulos *et al.*, 2006). Ceci explique le plus faible taux d'adduits dans les tumeurs. Ainsi les adduits observés dans une tumeur n'ont sans doute plus rien à voir avec les adduits qui ont généré la tumeur. Néanmoins, la présence de ces adduits indique clairement une exposition au cancérigène. La persistance d'un adduit *in vivo* dépend de plusieurs facteurs : la stabilité chimique du produit, la présence d'une réparation efficace et le 'turnover' de la macromolécule sur laquelle le produit chimique est fixé (Pfohl-Leszkowicz, 2008).

D'une manière générale la détection des adduits à l'ADN est un outil très sensible pour clarifier une source cancérigène, pour élucider un mécanisme de carcinogénicité et pour évaluer les effets génotoxiques des petites doses.

Des adduits similaires à ceux obtenus dans le rein de souris ont été observés dans des échantillons de reins et de vessie d'individus bulgares souffrant de BEN et de cancers des voies urinaires (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993c ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007 ) et chez des patients français opérés de cancer du rein et chez lesquels de l'OTA a été retrouvée dans le sang et les organes (Azémar *et al.*, 1998 ; Azémar, 2000 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2005a).

Certaines formes de dérivés d'OTA induisent des adduits à l'ADN et sont impliqués dans les lésions et les tumeurs rénales (Faucet *et al.*, 2004b ; Mantle *et al.*, 2010)

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré le potentiel d'adduction des aflatoxines, soit à l'ADN d'origine animale ou humaine, soit à des oligonucléotides. L'organe cible d'adduction est le foie, ce qui corrobore l'activité hépatocancérigène de cette toxine. (Pour une revue générale voir Pfohl-Leszkowicz, 1999).



## **Analyse bibliographique**

---

### **Partie 3**

### **Règlementation et impact économique**

# 1. Législation concernant les mycotoxines

## 1.1 Étapes de la détermination de la dose journalière admissible (DJA)

L'établissement de la législation s'effectue en deux temps. Tout d'abord la substance est évaluée sur la base des données toxicologiques disponibles (toxicités aiguës et chroniques). Divers comités émettent des avis, qui dans un deuxième temps vont servir pour définir les limites maximales de résidus. L'évaluation du risque se fait à deux niveaux (figure 25):

- Au niveau international, cette évaluation est réalisée par le JECFA (joint expert committee of Food and Additives) qui analyse également la toxicité des mycotoxines et élabore les recommandations au niveau du codex alimentarius.

- Au niveau européen, cette évaluation est réalisée par le "comité scientifique de l'alimentation humaine" (CSAH) afin d'établir la toxicité des mycotoxines, des facteurs de sécurité et émettre les avis qui serviront pour les législations applicables en Europe.

L'un et l'autre sont chargés de fixer une DJT (dose journalière tolérable) ou DHT (dose hebdomadaire tolérable) exprimée en  $\mu\text{g}$  ou  $\text{ng/kg}$  de poids corporel. Les législations européennes et les normes codex ne sont pas forcément identiques. Dans le cas des mycotoxines la législation européenne est souvent plus sévère que les normes Codex.

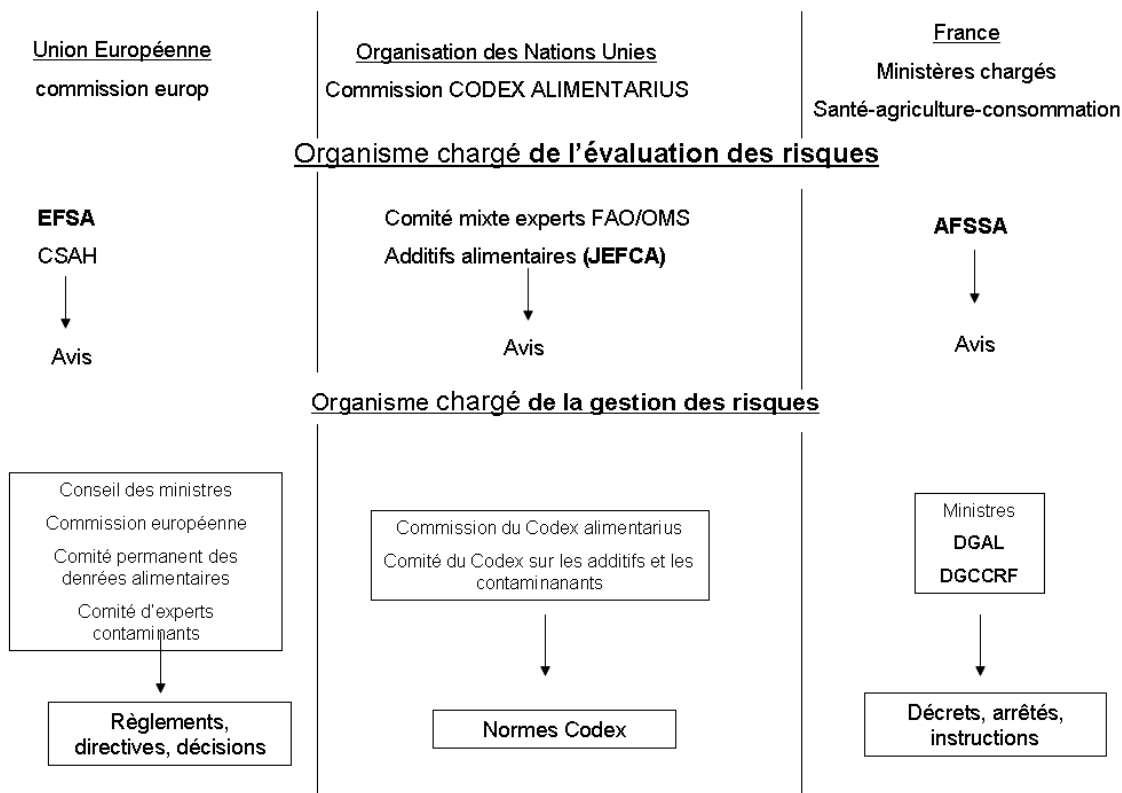


Figure 25 : Différents organismes impliqués dans la législation de résidus (adaptés des cours de toxicologie du Pr Pfohl-Leszkowicz)

### 1.1.1 La dose journalière admissible (DJT ou DJA)

La DJA est une estimation de la dose présente dans les aliments ou dans l'eau de boisson, exprimée en fonction du poids corporel, qui peut être ingérée tous les jours pendant toute la vie, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation. Elle est exprimée en milli (ou micro) gramme de produit par Kg de poids corporel. La DJA est fixée en se basant sur certains paramètres comme la dose virtuellement sûre et le facteur de sécurité (figure 26).

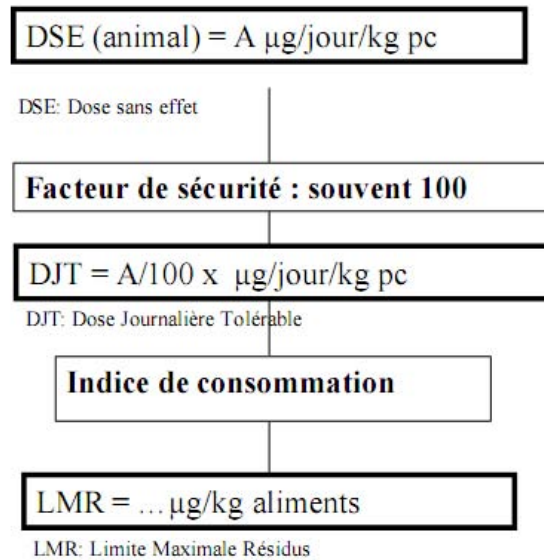


Figure 26 : Détermination de la DJA

### 1.1.2 La dose virtuellement sûre (DVS)

Dans le cas des substances cancérogènes, les experts américains utilisent des modèles d'évaluation quantitative des risques et évalue la DVS par la quantité pouvant induire un cancer supplémentaire pour 1000000 d'individus pour la vie entière.

### 1.1.3 Le facteur de sécurité (FS)

Le facteur moyen est de 100. Il est pris en compte les différences interspécifique et intraspécifique. La différence interspécifique résulte de l'extrapolation de l'animal à l'homme, tenant en compte des différences maximales de toxicité rapportée par la littérature (figure 27). La différence intraspécifique tient compte des différences de sensibilité entre les individus de la même espèce (âge, sexe, pathologie, carence). Pour des molécules entraînant des effets irréversibles, le facteur de sécurité est de 500. Pour les substances cancérogènes, le facteur est estimé à 5000.

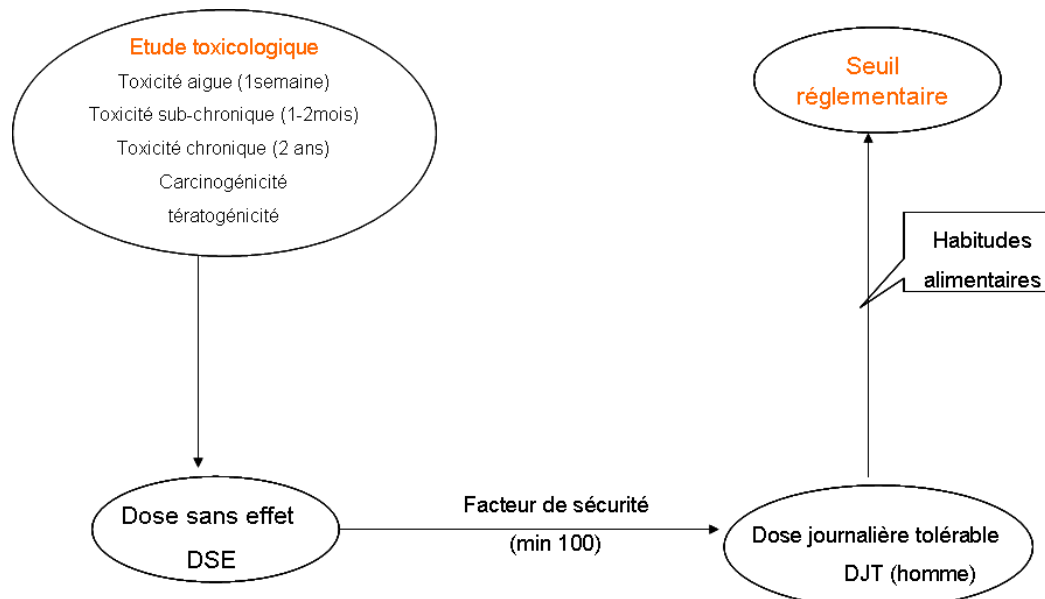


Figure 27 : Etapes de détermination du seuil autorisé de contamination en mycotoxine

## **1.2 Doses journalières admissibles des mycotoxines**

### **1.2.1 Dose journalière admissible d'OTA**

La dose journalière a été établie par le JECFA sur la base de l'effet néphrotoxique chez le porc. La dose sans effet est de 8µg/kg pc/j soit une dose journalière tolérable de 14ng/kg pc/j pour un homme de 60 kg et un facteur de sécurité de 500. Comme cette toxine s'accumule, la dose tolérable est en fait exprimée en dose hebdomadaire soit 100 ng/kg pc/ semaine.

Sur la base de l'effet cancérogène, la DJT est de 5 ng/kg pc/j. Il est à noter que la dose virtuellement sûre est de 1,8 ng/kg pc/j (Kuiper-Goodman *et al.*, 2010).

L'OTA est classé par le CIRC depuis 1993 en catégorie 2B (cancérogène probable pour l'homme).

### **1.2.2 Dose journalière admissible de la ZEA**

Les DJA ne portent que sur les effets observés sur la reproduction chez le singe. La DSE de 50 µg/kg/j permet de calculer une limite toxicologique de 100ng/kg pc/j prenant en compte un facteur de sécurité de 500. Le JECFA en 2000 a quant à lui établi une dose journalière admissible à titre provisoire de 0,5 µg/kg pc/j sur la base d'une dose sans effet de 40µg/kg pc chez le porc exposé 15 jours et un facteur de sécurité de 80. Néanmoins au regard des études récentes réalisées par Gajecka *et al.* (2011), cette dose admissible n'est peut être pas totalement protectrice. En effet le traitement de truie pré-pubère pendant 48 jours avec 20µg/kg pc entraîne un hyperœstrogénisme et un mauvais développement des ovaires.

La ZEA est classée par le CIRC dans le groupe 3, c'est-à-dire qu'on ne peut pas se prononcer quant à son pouvoir cancérogène

### **1.2.3 Dose journalière admissible d'AF**

Comme l'aflatoxine est une mycotoxine cancérogène génotoxique, il n'existe théoriquement pas de doses sans effet. Le JECFA préconise une gestion du risque sur le modèle ALARA '*as low as reasonably achievable*', c'est-à-dire aussi faible que possible, indiquant qu'une quantité de 1ng/kg de poids corporel par jour a peu de risque d'augmenter l'incidence de tumeur du foie dans une population non atteinte par le virus de l'hépatite B.

Les aflatoxines sont classés par le CIRC depuis 1976 dans le groupe 1, c'est-à-dire cancérogène pour l'homme.

### **1.2.4 Dose journalière admissible des trichothécènes**

Le JECFA a établi une dose provisoire journalière acceptable par jour (PMTDI) en DON équivalente à 1µg/kg de poids corporel sur la base d'un NOEL de 100µg/kg chez la souris vis-à-vis des effets sur le système immunitaire (WHO, 2002).

Le DON a été classé dans la catégorie 3 (preuve insuffisante sur sa carcinogénicité) du CIRC.

### **1.2.5 Dose journalière admissible des FB**

La dose journalière admissible temporaire a été établie, sur la base d'une DES pour la néphrotoxicité en prenant un facteur de sécurité de 100. A partir des données relatives à l'apparition de l'œdème pulmonaire chez le porc (LOAEL '*Lowest Observed Adverse Effect Level*' 5 mg/kg x j), on peut extrapoler une Dose Journalière Tolérable (DJT) de 5 µg/kg x j. Néanmoins, cet effet n'est pas l'effet le plus sensible, puisqu'il apparaît à des doses plus faibles des hépatotoxicités et/ou des néphrotoxicités ainsi que des cancers. C'est pourquoi, la valeur limite en FB<sub>1</sub> pour l'homme doit être calculée à partir de l'effet cancérogène chez le rat et la souris (NOAEL '*No Observed adverse effect level*' de 5 mg/kg dans la nourriture soit en extrapolant par rapport consommation de nourriture par les rats et à la courbe de croissance ; à 1,5 mg/kg pc/j). Comme il s'agit d'un cancérogène, la dose virtuellement sûre est obtenue en appliquant un facteur de sécurité de 5000 et serait donc de 300 ng /kg pc /j. En février 2002, la FB<sub>1</sub> a été classée dans le groupe 2B (potentiellement cancérogène pour l'homme) par le CIRC (IARC, 2002).

### 1.3 Réglementation des mycotoxines dans les denrées alimentaires

A l'heure actuelle, les mycotoxines les plus préoccupantes sont réglementées (aflatoxines, ochratoxine A, fumonisines et zéaralénone) (tableau 8).

En ce qui concerne l'alimentation humaine, le règlement européen N° 1881 / 2006 en date du 19 décembre 2006 (JOCE du 20/12/2006), concerne les teneurs maximales pour un certain nombre de contaminants présents dans les denrées alimentaires. Ce texte dépasse le cadre des contaminations par les mycotoxines. Les articles n° 7 et de 21 à 38 concernent plus spécifiquement les mycotoxines.

Le règlement (CE) N°1126/2007 de la commission du 28 septembre 2007 modifiant le règlement (CE) no 1881/2006, porte sur la fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne les toxines de *Fusarium* dans le maïs et les produits à base de maïs. Ce dernier a été modifié par le règlement (EU) N°105/2010 de la commission du 5 février 2010, portant sur fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires (épices) en ce qui concerne l'ochratoxine A.

Concernant les aflatoxines, la commission réunie le 26 février 2010 a émis un nouveau rapport (N°165/2010) portant sur la fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans denrées alimentaires (Arachides, noix et d'autres oléagineux) en ce qui concerne les aflatoxines.

Tableau 8 : Teneurs maximales (en µg/kg) en mycotoxines pour les produits alimentaires destinés à l'alimentation humaine.

Les produits alimentaires	AFB <sub>1</sub>	AFM <sub>1</sub>	Somme de B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> et G <sub>2</sub>
Arachides destinées à être soumises à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	8,0		15,0
Amandes, pistaches et noyaux d'abricot destiné à être soumis à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	12,0		15,0
Arachides, fruits à coque et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2,0		4,0
Fruits séchés destinés à être soumis à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	5,0		10,0
Fruits séchés et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2,0		4,0
Toutes les céréales et tous les produits dérivés des céréales, y compris les produits de céréales transformés	2,0		4,0
Maïs destiné à être soumis à un traitement de triage ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédient de denrées alimentaires	5,0		10,0
Catégories suivantes d'épices: Capsicum spp (fruits séchés dérivés, entiers ou en poudre, y compris les piments, la poudre de piment, le poivre de Cayenne et le paprika) ; Piper spp (fruits dérivés, y compris le poivre blanc et noir) ; Myristica fragrans (noix de muscade) ; Zingiber officinale (gingembre) ; Curcuma longa (safran des Indes)	5,0		10,0
Lait cru, lait traité thermiquement et lait destiné à la fabrication de produits à base de lait		0,5	
Préparations pour nourrissons et préparations de suite, y compris le lait pour nourrissons et le lait de suite		0,025	
Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales spécifiquement pour les nourrissons	0,1	0,025	
Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	0,1		

<b>Ochratoxine A</b>	Céréales brutes	5,0
	Tous les produits dérivés de céréales brutes, y compris les produits de céréales transformés et les céréales destinés à la consommation humaine directe	3,0
	Raisins secs (raisins de Corinthe, sultanines et autres raisins secs)	10,0
	Grains de café torréfié et café torréfié moulu, à l'exception du café soluble	5,0
	Café soluble (café instantané)	10,0
	Vins (y compris les vins mousseux, mais à l'exclusion des vins de liqueur et des vins ayant un titre alcoométrique volumique minimal de 15 %) et vins de fruits	2,0
	Vins aromatisés, boissons aromatisées à base de vin et cocktails aromatisés de produits vitivinicoles	2,0
	Jus de raisin, jus de raisin concentré reconstitué, nectar de raisin, moût de raisins et moût de raisins concentré reconstitué, destinés à la consommation humaine directe	2,0
	Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	0,5
	Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales	0,5
	Capsicum spp. (fruits séchés dérivés, entiers ou en poudre, y compris les piments, la poudre de piment, le poivre de Cayenne et le paprika) Piper spp. (fruits dérivés, y compris le poivre blanc et le poivre noir) Myristica fragrans (noix de muscade) Zingiber officinale (gingembre) Curcuma longa (safran des Indes) Mélanges d'épices contenant une ou plusieurs des épices susmentionnées	30 g/kg du 1 <sup>er</sup> juillet 2010 au 30 juin 2012 15 g/kg du 1 <sup>er</sup> juillet
	Régisse (Glycyrrhiza glabra, Glycyrrhiza inflata et autres espèces). Bois de régisse, ingrédient pour infusion	20 µg/kg
	Extrait de régisse, pour utilisation dans des produits alimentaires, en particulier les boissons et la confiserie	80µg/kg
	Café vert, fruits séchés autres que les raisins secs, bière, cacao et produits à base de cacao, vins de liqueur, produits à base de viande, épices et régisse	----
<b>Zéaralénone</b>	Céréales brutes sauf maïs	100
	Maïs brut à l' exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide	350
	Farines autres que de maïs, germes, sons et céréales pour consommation directe,	75
	Huile de maïs raffinée	400
	Pain, pâtisseries, biscuits, snacks, petits déjeuners	50
	Maïs destiné à la consommation humaine directe, collations à base de maïs et céréales pour petit-déjeuner à base de maïs	100
	aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge 20	20
	Préparations à base de céréales pour alimentation infantile	20
<b>Fumonisines B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub></b>	Maïs brut à l' exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide	4000
	Maïs destiné à la consommation humaine directe, aliments à base de maïs destinés à la consommation humaine directe	1000
	Céréales pour petit-déjeuner à base de maïs et collations à base de maïs	800
	Préparations à base de maïs et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	200
<b>Déoxynivalénol</b>	Céréales brutes, autres que le blé dur, l'avoine et le maïs	1250
	Blé dur et avoine bruts	1750
	Maïs brut à l' exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide	1750
	Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine de céréales, son et germe en tant que produit fini commercialisé pour la consommation humaine directe, à l'exception des denrées alimentaires figurant aux points	750
	Pâtes (sèches)	750
	Pain (y compris les petits produits de boulangerie), pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit-déjeuner	500
	Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	200

## 1.4 Réglementation dans les céréales destinées à l'alimentation animale

En matière d'aliments à destination des animaux, l'Aflatoxine B<sub>1</sub> (tableau 9) est la seule mycotoxine réglementée (Directive 2002 32/CE du 07 05 02). Contrairement au principe de la recommandation, les seuils réglementaires ont un caractère obligatoire. Tout dépassement rend l'aliment impropre à la consommation.

Tableau 9 : Teneurs maximales (en µg/kg) en AFB<sub>1</sub> pour les aliments destinés à l'alimentation animale (Directive 2002 32/CE du 07 05 02)

Mycotoxines	Matrices	Seuils (ppb)
aflatoxines	Matières premières	50
	Sauf pour les matières premières issues du maïs et arachides	20
	Aliments complets	
	Bovins viandes, ovins, caprins	50
	Veaux et agneaux	10
	Bovins laitiers	5
	Porc et volailles	20
	autres	10

Tableau 10 : Teneurs maximales recommandées (en µg/kg) en mycotoxines pour les aliments destinés à l'alimentation animale (recommandations 2006/576/CE)

Mycotoxines	Matrices	Seuils (ppb)
DON	Matières premières	
	Céréales et sous produits céréaliers	8000
	Sous produits du maïs	12000
	Aliments complémentaires ou complets	900
	Exception pour aliments porcs	2000
ZEA	Matières premières	
	Céréales et sous produits céréaliers	2000
	Sous produits du maïs	3000
	Aliments complémentaires ou complets	
	Porcelets et jeunes truies	100
	Truies et porcs à l'engraissement	250
OTA	Veaux, bétail laitier, ovins, caprins	500
	Matières premières	
	Céréales et sous produits céréaliers	250
	Aliments complémentaires ou complets	
	Porcs	50
Fumonisines (FB <sub>1</sub> +FB <sub>2</sub> )	volailles	100
	Matières premières	
	Céréales et sous produits céréaliers	6000
	Aliments complémentaires ou complets	
	Porcs, chevaux, lapins, animaux de compagnie	5000
	poissons	10000
	Volailles, veaux (<4mois), agneaux et chevreaux	20000
	Ruminants adultes (>4mois), visons	50000

Les recommandations 2006/576/CE du 17 Août 2006, parus au journal officiel le 23 Août 2006, concernent les mycotoxines - produites au champ par les *Fusarium* : Désoxynivalénol (DON), Zéaralénone (ZEA), Fumonisines (FB); - produites au stockage par les *Aspergillii* et *Penicillia* : ochratoxine A (OTA). Ces recommandations sont représentées dans le tableau 10.

Ces recommandations concernent les aliments pour les animaux de ferme (les porcs et les volailles) dans le but d'éviter des effets toxiques aigus. Les animaux familiers ne sont mentionnés que pour les fumonisines mais avec un seuil unanimement considéré comme trop élevé (Snac, 60millions de consommateurs, 2008). Ces mesures sont fondées essentiellement sur des cas de mortalité. Il a été observé des effets d'altération à l'ADN avec des doses de mycotoxines (OTA et FB<sub>1</sub>) considérées comme sûres (Domijan *et al.*, 2006 ; voir Chapitre II de cette thèse).

## 1.5 Evolution de la réglementation dans le monde

À l'échelle mondiale, en 2003, 99 pays, au moins, disposaient de réglementations concernant les mycotoxines présentes dans les produits d'alimentation humaine et/ou animale, soit une hausse d'environ 30 pour cent par rapport à 1995. Au total, ces pays regroupent près de 87 pour cent des habitants de la planète. La figure 28 présente la part de la population mondiale qui vivait dans des régions où étaient en vigueur des réglementations relatives aux mycotoxines en 1995 et en 2003. Il apparaît qu'en 1995, 23 pour cent de la population mondiale vivaient dans une région où, semble-t-il, il n'existait aucune réglementation en matière de mycotoxine. Cette proportion était tombée à 13 % en 2003, grâce aux progrès enregistrés en Amérique latine et en Europe et surtout en Afrique et en Asie/Océanie (Rapport FAO, 2003).

Tous les pays qui étaient dotés d'une réglementation relative aux mycotoxines en 2003 disposaient, au minimum, de limites réglementaires pour l'aflatoxine B<sub>1</sub> ou pour la somme des aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> dans les produits d'alimentation humaine et/ou animale, situation déjà observée en 1995. Il existe en outre des réglementations spécifiques pour plusieurs autres mycotoxines (à savoir, l'aflatoxine M<sub>1</sub>, les trichothécènes [désoxynivalénol, diacétoxyscirpénol, toxine T-2 et HT-2], les fumonisines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub>, l'agaricine, les alcaloïdes de l'ergot de seigle, l'ochratoxine A, la patuline, les phomopsines, la stérigmatocystine et la zéaralenone). Le nombre de pays qui réglementent les mycotoxines a considérablement augmenté au fil des ans (Rapport FAO, 2003).

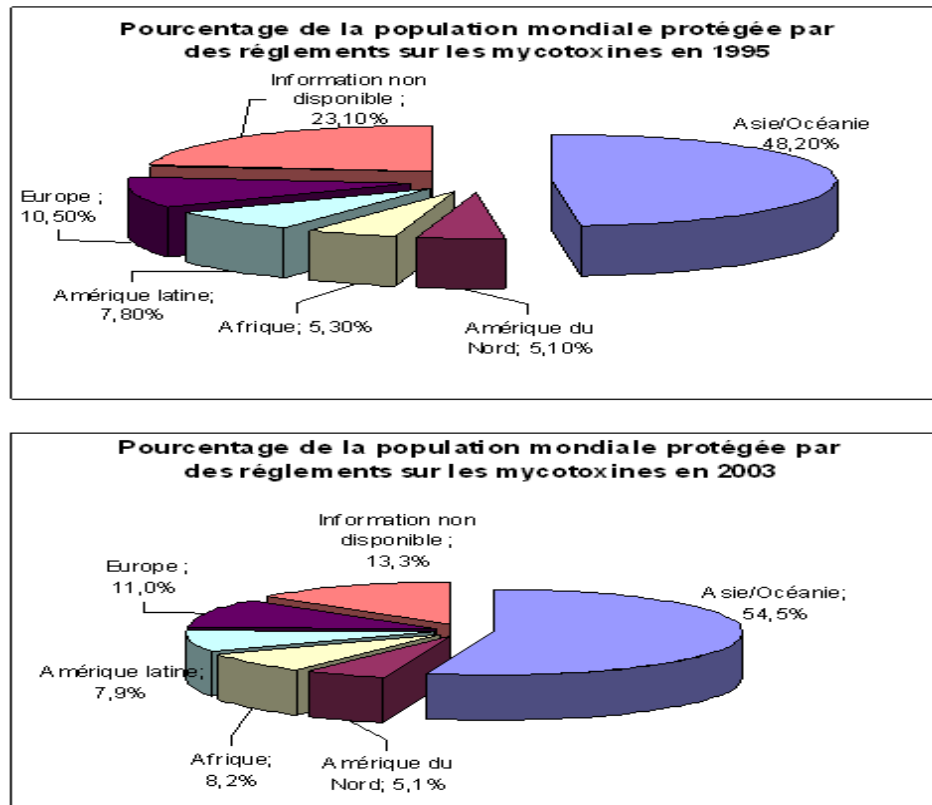


Figure 28 : Pourcentage de la population mondiale protégée par des réglementations sur les mycotoxines (Rapport FAO, 2003)

A l'heure actuelle, la réglementation ne concerne que les mycotoxines prises isolément, que ce soit dans l'alimentation humaine ou animale. Aucune législation ne prend en compte l'effet de la co-contamination.



## 2. Impact économique des mycotoxines

Peu de travaux ont été entrepris dans le but d'étudier l'impact financier et économique des mycotoxines sur des populations spécifiques aussi bien dans les pays industrialisés que les pays développés. L'impact économique des mycotoxines dans les pays en développement est vraisemblablement du même ordre, voire plus important, en particulier dans les zones géographiques du globe les plus chaudes et les plus humides.

Les pertes économiques se produisent en raison de la perte de rendement 1) dus à des maladies induites par des champignons toxigènes ; 2) la valeur des récoltes réduites résultant d'une contamination par les mycotoxines ; 3) des pertes de productivité des animaux, des problèmes de santé liés aux mycotoxines ; et 4) les coûts de la santé humaine.

L'impact financier des mycotoxines concerne non seulement les risques pour la santé de l'homme et les animaux domestiques, mais aussi la dégradation de la qualité des produits agricoles commercialisés tant pour le marché intérieur que pour l'exportation.

### 2.1 Impact sur la production agricole

La présence de mycotoxines dans les aliments, pose un problème de sécurité sanitaire des aliments. Un rapport de la FAO met en évidence le fait que la production céréalière mondiale est insuffisante pour répondre à la demande. Actuellement on estime qu'environ 25% des céréales produites actuellement à l'échelle internationale sont contaminées par des mycotoxines (Davegowda *et al.*, 1998 ; thèse Zinedine, 2004). Ces pertes viennent amplifier le problème lié à une production insuffisante.

Il est très difficile d'évaluer de manière sûre la perte économique due aux mycotoxines. La FDA « US Food and Drug Administration », à partir d'un modèle, a évalué la perte aux Etats-Unis engendrée par les aflatoxines, le DON et les fumonisines, à 392 millions de dollars (CAST, 2003).

La FAO a estimé à environ 5 milliards de dollars les pertes économiques annuelles dues aux mycotoxines en incluant à la fois les dommages faits aux cultures et aux élevages (Bhat *et al.*, 1999). Le retrait du marché des aliments contaminés en mycotoxines coûte de l'ordre de 342 millions de dollars annuellement aux Etats-Unis. Les pertes au niveau de la production animale sont estimées à 8,4 millions de dollars. Pour le maïs seul, le coût annuel des contaminations par les aflatoxines, la fumonisine B<sub>1</sub> et du DON est évalué respectivement à 163, 40 et 2 millions de Dollars (Jouany, 2011).

Les fruits secs et les noix présentent un risque élevé de contamination par les aflatoxines, avec de forts impacts sociaux et économiques résultant de limites strictes de l'UE. Une étude réalisée par le JECFA /OMS (Codex Alimentarius Commission, avril 2007, CX / CF 071 / 9) estime que l'application des limites de l'UE pour les aflatoxines (4 ppb) sur les produits «prêt-à-consommer» (les amandes, les noisettes et les pistaches) a un impact économique sur le rejet d'environ 9 millions d'euros dans le monde entier (<http://www.mycored.eu/d/29/Mycotoxins/>).

Les raisins et leurs produits transformés sont très importants en Europe, où environ 47% du vignoble des mondes (4,8 millions d'ha) sont trouvés, et 75% de vin au monde (190 millions d'hl sont produits). Les données sur l'impact économique de l'ochratoxine A dans les raisins et le vin ne sont pas disponibles ou ne sont pas dans le domaine public car leur divulgation pourrait entraîner un effondrement du marché du vin, qui est un produit de grande valeur, mais n'est pas considéré comme essentiel (<http://www.mycored.eu/d/29/Mycotoxins/>).

Lubulwa et Davis (1994) ont essayé de donner une estimation du dégât économique annuel, réparti sur différents secteurs, provoqué par différents champignons et les aflatoxines, en s'appuyant sur des données recueillies en Indonésie, aux Philippines et en Thaïlande (tableau 11). Ces auteurs ont estimé que 20 à 29 % de la production du maïs et 22 à 45 % de la production d'arachide provenant de ces trois pays dépassent une concentration en aflatoxines de 50µg/ kg et sont de ce fait soumis à des restrictions d'exportations vers les pays disposant des réglementations sur les limites des résidus de mycotoxines.

Tableau 11 : Estimation du dégât économique en Millions de \$ Australiens, causé par différents champignons et les aflatoxines en Indonésie, aux Philippines et en Thaïlande en 1991 (Lubulwa et Davis, 1994)

Secteur	Nature des dégâts	Maïs	Arachide	Maïs et Arachide
Dégradation du produit commercialisé	Détérioration de l'aspect extérieur des graines. Rancissure, perte du pouvoir germinatif	70,9	36,8	107,7
Intoxication humaine	Cancer primaire du foie dû à l'aflatoxine	176,5	114,7	291,2
Intoxication des animaux domestiques (volaille, porc, bétail)	Diminution de croissance, stérilité, effets mutagènes, tératogènes, carcinogènes	71,7	6,2	77,9
Total		319,1	157,7	476,9

Maaroufi *et al.* (1995) ; Miraglia *et al.* (1993, 1995) ; Miraglia et Brera (2000) et Beretta *et al.* (2002) ont montré que les céréales et leurs produits dérivés originaires des pays de la région méditerranéenne peuvent être contaminés par les mycotoxines (OTA, ZEN et FB<sub>1</sub>) vu le climat de la région caractérisé par une chaleur humide et une température élevée favorisant la croissance des moisissures toxigènes.

A cause des périodes de sécheresse qu'a connues le Maroc ces dernières décennies, la production céréalière a enregistré une diminution de 25 à 85 %, ce qui entraîne un approvisionnement d'autres pays étrangers pour satisfaire le marché national (thèse Zinedine, 2004)

Plus la réglementation est stricte, et plus la quantité de matières premières à jeter sera importante. Cela peut créer de graves problèmes économiques aux pays exportateurs de produits agricoles, problèmes à évaluer et à comparer avec le risque mycotoxique.

Afin d'éviter une réglementation trop stricte, celle-ci est toujours en évaluation. Par exemple, la réglementation sur les aflatoxines dans les noix est considérée comme trop stricte à l'heure actuelle. De nombreuses études ont alors été effectuées pour évaluer le risque lié à une augmentation de seuil. Dans un avis adopté en janvier 2007, le groupe scientifique de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) sur les contaminants de la chaîne alimentaire (CONTAM) a conclu que l'augmentation, pour les amandes, noisettes et pistaches, des taux maximum actuels autorisés d'aflatoxine totale dans l'UE de 4 µg/kg à 8 ou 10 µg/kg n'aurait que des effets mineurs sur le risque de cancer vu l'exposition alimentaire estimée et la marge d'exposition calculée. En 2008, le *Codex Alimentarius* a défini un taux maximal d'aflatoxines totales de 10 µg/kg dans les amandes, noisettes et pistaches prêtes à la consommation, ce qui représente un taux supérieur à celui actuellement en vigueur dans l'UE (4 µg/kg d'aflatoxines totales), taux qui finalement en 2010, a été porté en Europe à 8 µg/kg.

## 2.2 Impact sur les animaux

Les conséquences économiques engendrées par les mycotoxines sont lourdes. Dans les pays d'Amérique du Nord, la productivité des animaux connaît des pertes énormes estimées à des billions de dollars par année (Miller, 1998).

La contamination des aliments par l'OTA est un problème presque exclusivement des animaux de bétail monogastriques, principalement en raison des pertes économiques causées par la réduction des performances de production, à l'impact négatif sur la santé animale et le bien-être et à la possibilité du transfert de toxine dans tissus des animaux comestibles (Battacone *et al.*, 2010).

La viande de porc est la viande la plus consommée au monde, d'où l'intérêt d'améliorer sa qualité vis-à-vis de la santé humaine. Souvent retrouvé sur des céréales telles que le blé, l'orge, et le maïs, le DON est largement répandu au niveau mondial. Etant donné la proportion importante de céréales dans leur alimentation, les animaux de rentes sont particulièrement exposés au DON, et parmi les espèces animales concernées, le porc se révèle particulièrement sensible. Chez les porcs, les premiers effets d'une exposition au DON consistent en une baisse de consommation d'aliment, des performances de croissance et une altération des fonctions immunitaires et de la reproduction (Etienne & Wache, 2008). La présence de DON dans l'alimentation des porcs peut entraîner des problèmes sanitaires et économiques importants pour les professionnels de la filière porcine. La sensibilité importante du porc vis-à-vis du DON nécessite donc une vigilance particulière pour cette espèce.

Lubulwa et Davis (1994) ont étudié les pertes économiques imputables à la présence d'aflatoxine dans le maïs et les arachides dans les pays du sud-est asiatique (Thaïlande, Indonésie et Philippines). Ils ont conclu que le maïs contaminé représentait environ 66 % des pertes totales, tandis que les pertes imputables à l'altération et aux effets délétères sur la santé humaine et animale étaient respectivement de 24, 60 et 16 pour cent du total. L'étude n'a cependant tenu compte que de pertes liées à la morbidité et au décès prématuré par cancer. Il est donc probable que, lorsque l'on y ajoute les incidences sur la santé humaine de l'effet immunosuppresseur des aflatoxines (et d'autres mycotoxines), le chiffre des pertes dues aux aflatoxines est beaucoup plus important (<http://www.fao.org/docrep/005/y1390f/y1390f02.htm>).

La zéaralénone induit des troubles de la reproduction. Des effets oestrogéniques variés tels qu'une diminution de la fertilité, une augmentation des résorptions embryolétales, une diminution de la taille et du nombre des portées, ainsi que des changements de niveaux sériques de progestérone et d'oestradiol ont été observés chez la souris, le rat, le cobaye et le lapin (JECFA, 2000). Les pertes causées par la ZEA sont surtout liées à l'infertilité des animaux, et par conséquent à la diminution du nombre d'élevage. Cet aspect de perte est difficile à quantifier.

Il a été également observé depuis quelques années une diminution de fertilité et donc de portés chez les animaux de compagnie (chats et chiens). L'activité ciblée de la ZEA sur la fonction de reproduction de la chienne a été confirmée (Gajecka *et al.*, 2004a et b).

## **Analyse bibliographique**

---

### **Partie 4**

### **Désactivation des mycotoxines**

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les mycotoxines sont des contaminants alimentaires pouvant se retrouver dans les produits finis vu leur stabilité. Bien qu'il existe des stratégies préventives pour éviter le développement de moisissures, comme la mise au point d'un système « HACCP » (Hazard Analysis Critical Control Point), le suivi des « bonnes pratiques agricoles » avant la récolte et pendant le stockage, ces stratégies ne sont pas suffisantes pour empêcher la contamination par les mycotoxines.

La mise au point de traitements industriels pour la décontamination des denrées alimentaires contaminées est devenu un des objectifs majeurs pour subvenir aux besoins mondiaux en aliment, tout en garantissant la sécurité sanitaire des aliments aussi bien pour les humains que pour les animaux.

Les méthodes de décontamination peuvent être divisées en méthodes physiques (nettoyage et tri, lavage, moulage humide, cuisson, extrusion, désactivation thermique, irradiation,...), chimiques (extraction par des solvants, traitements avec des acides et des bases,...) et biologiques (levures, bactéries lactiques) [pour des articles généraux voir Amézqueta *et al.*, 2009; Kabab *et al.*, 2006; Kabab, 2010 ; Varga *et al.*, 2010; Jard *et al.*, 2011]. Ces méthodes doivent diminuer la concentration en toxine voire la dégrader, sans produire des résidus de dégradation toxiques, ni diminuer les qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments (Jemmali (1979) et Park *et al.* (1988).

Nous limiterons ce chapitre aux méthodes curatives de détoxification biologique essentiellement vis-à-vis de l'OTA et de la ZEA.

## 1. Agents adsorbants ou désactivants

### 1.1 L'adsorption

Le coût et les limitations des traitements physiques et chimiques ont conduit à des études fondées sur la désactivation des mycotoxines directement dans le tube digestif des animaux.

La technique la mieux connue et la plus largement étudiée, pour décontaminer les nourritures contaminées par les mycotoxines repose sur l'emploi de substances adsorbantes, inertes au point de vue nutritionnel, et capables de fixer les mycotoxines présentes dans le tube digestif des animaux, afin de les immobiliser et de réduire leur biodisponibilité.

Les caractéristiques importantes de l'adsorption sont : la charge totale, la distribution de la charge, la taille des pores et l'accessibilité de la surface. D'autre part, les propriétés de la molécule adsorbante, des mycotoxines comme la polarité, la solubilité, la taille, la forme, et dans le cas des composés ionisés la distribution de la charge et constantes de dissociation jouent un rôle important.

#### 1.1.1 Le charbon actif

Des études faites chez des chèvres ont montré que de fortes quantités de charbon activé sont bénéfiques pour limiter une intoxication aiguë due aux aflatoxines (Huwang *et al.*, 2001). Le charbon activé permet d'adsorber certaines mycotoxines de stockage comme les aflatoxines à raison de 120 mg/g ; et l'OTA à raison de 124 mg/g (Balzer *et al.*, 2004). La capacité du charbon actif (AC), préparé à partir des noyaux de la cerise (CS) par activation avec  $H_3PO_4$ ,  $ZnCl_2$  ou KOH, à supprimer l'OTA à partir de deux vins rouges italiens a été étudiée. Seul celui activé au KOH à 900°C a permis de diminuer de moitié la quantité d'OTA. Cependant, l'index polyphénolique et l'intensité de la couleur ont été modifiés par ce procédé (Oliveras-Marín *et al.*, 2008). Cela est dû au fait que l'adsorption par le charbon actif est relativement non spécifique. Des tests *in vitro* ont montré que l'ajout de 1% de charbon actif permet l'adsorption complète de l'OTA en solutions aqueuses. Cet effet n'a pas été influencé par le pH variant de 3-8 (Plank *et al.*, 1990). Dans une autre étude, il a été montré que le charbon actif permet de réduire significativement le taux d'OTA dans le sang, la bile et les tissus de porcs. L'ajout de charbon activé 1% dans l'alimentation des porcs contaminée en OTA (1mg/kg), provoque une légère diminution du taux d'OTA dans le sang des animaux. L'ajout de 10 fois plus de charbon actif abouti à une réduction de 50% à 80% d'OTA dans le sang et les tissus des animaux (Bauer *et al.*, 1994). L'ingestion de charbon activé (5%) pendant 16 semaines a réduit l'absorption d'OTA, cependant le taux sérique en vitamine E a aussi été réduit par rapport aux animaux témoins (Plank *et al.*, 1990). Il semble donc que le charbon actif ne soit pas assez spécifique pour pouvoir être utilisé de manière systématique.

### 1.1.2 Les aluminosilicates

Les argiles (les aluminosilicates, la bentonite, les zéolites, ...) sont aussi utilisées comme adsorbants depuis une vingtaine d'années. Les zéolites permettent une adsorption partielle du DON, en revanche d'autres argiles comme la kaolinite, la sépiolite et la montmorillonite ne fixent que très médiocrement les trichothécènes (Balzer *et al.*, 2004).

Les aluminosilicates de sodium et de calcium hydratés (HSCAS) se sont avérés les adsorbants les plus prometteurs pour prévenir l'aflatoxicose chez les animaux de la ferme (Starkl, 2004a, 2004b). L'ajout de 0,5% de HSCAS dans l'alimentation a permis de diminuer de 80% l'effet inhibiteur de la croissance provoquée par l'aflatoxine chez les porcs (Lindemann *et al.*, 1993), chez les poulets (Kubena *et al.*, 1988 et 1993b ; Phillips *et al.*, 1988), et chez dindonneaux mâles (Kubena *et al.*, 1991).

Ces résultats sont en adéquation avec les études de BIOMIN réalisées (Juin 1999- Mai 2000) en collaboration avec l'université des sciences agricoles (institut pour la géologie appliquée) à Vienne. (Starkl, 2004a). D'autre part, les aluminosilicates ont l'inconvénient de fixer fortement les vitamines et les minéraux (Huwing *et al.*, 2001).

Les HSCAS n'améliorent la toxicité de l'OTA ni chez les poulets (Huff *et al.*, 1992), ni chez les porcs (Bauer *et al.*, 1994), ni *in vitro* (Galvano *et al.*, 1998).

Une étude a été menée pour évaluer la capacité des aluminosilicates (HSCAS) à protéger des souris (Balb) contre la génotoxicité et la cytotoxicité induite par ZEA. La cytotoxicité et la génotoxicité de la ZEA a été évaluée par l'augmentation de la fréquence des micronoyaux polychromes des érythrocytes (PCEMN) et des aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de cellules. L'exposition simultanée par voie intra-gastrique de HSCAS (400-800 mg/kg pc) et de ZEA (40mg/kg pc) abouti à une réduction du nombre de PCEMN et une diminution de la fréquence des aberrations chromosomiques, et une augmentation du nombre d'érythrocytes polychromatophiles (PCE) dans les cellules de la moelle osseuse, par rapport à ceux du groupe traité avec ZEA seule (Abbès *et al.*, 2007).

La ZEA provoque l'augmentation de l'hématocrite, l'hémoglobine, les globules blancs: les lymphocytes, les éosinophiles, les neutrophiles, les monocytes et les la plupart des paramètres biochimiques sériques. Elle réduit considérablement les plaquettes et induit des changements dégénératifs dans le foie et les tissus rénaux chez les souris (Balb) (Abbès *et al.*, 2006). Les foies de souris traitées avec ZEA (40mg/kg pc ou 500 mg/kg pc) a montré une nécrose focale (FN), une dilatation vasculaire et une infiltration lymphoïde (LI). Les foies de souris traitées avec les HSCAS seules (400mg/kg pc ou 5 g/kg pc) ou en combinaison avec ZEA a révélé une même image histologique par rapport à celle du groupe témoin (Abbès *et al.*, 2006). Toutefois, les reins des souris traitées avec les HSCAS seules, ou avec les HSCAS associés à la ZEA a également montré image histologique normale (Abbès *et al.*, 2006).

Il a été mis en évidence que le mélange des HSCAS avec ZEA induit un rétablissement des paramètres hématologiques (hématocrite, lymphocytes, éosinophiles, neutrophiles et monocytes qui rediminuent), les niveaux d'activités enzymatiques (aspartate amino-transférase (ASAT), alanine amino-transférase (ALAT), alcalines phosphatase (ALP), la bilirubine conjuguée (BILD), de la bilirubine total (BILT) et le taux de créatinine sérique (CRE). L'examen histologique des reins des souris traitées uniquement avec la ZEA a révélé un gonflement des cellules épithéliales (SEC) du tubule proximal, une dégénérescence granuleuse (GD), et la dilatation des vaisseaux sanguins (Abbès *et al.*, 2006).

### 1.1.3 Les Zéolites

Les zéolites naturelles ou synthétiques ont été utilisées dans l'alimentation des animaux, principalement pour améliorer les performances des traites. L'efficacité *in vivo* des zéolites à améliorer les conséquences de l'aflatoxicose, principalement dans les élevages de volailles (poulet de chair, oies, poules pondeuses) a été observée (Papaioannou *et al.*, 2005).

### 1.1.4 Choléstyramine

Une autre stratégie consiste à limiter les effets toxiques des mycotoxines par la cholestyramine. La cholestyramine est une résine échangeuse d'anions qui est utilisée pour fixer les acides biliaires dans le tractus gastro-intestinal et réduire la réabsorption des lipoprotéines de faible densité (LDL) et du cholestérol.

*In vitro*, la capacité de fixation de cette résine pour l'OTA et la ZEA est respectivement de 9,6 mg/g (Bauer *et al.*, 1994) et de 0,3 mg/g (Ramos *et al.*, 1996b). Cependant *in vivo*, la cholestyramine n'a eu qu'un très faible effet sur la réduction de la concentration d'OTA dans le sang, la bile, et les tissus chez les porcs (Bauer *et al.*, 1994). *In vitro*, des incubations avec la ZEA (0,1 µg/ml) et des concentrations croissantes de cholestyramine (0,001 à 1 mg/ml) ont montré une adsorption partielle de la ZEA (11%) et totale 100% avec 0,025 mg/ml et 1 mg/ml de cholestyramine, respectivement (Underhill *et al.*, 1995).

*In vivo*, la cholestyramine ajoutée à l'alimentation des souris (2,5 g/kg d'aliment) a permis de réduire les effets toxiques de ZEA (6mg/kg d'aliment) (Underhill *et al.*, 1995).

L'effet de la choléstyramine (CHA) sur la néphrotoxicité et la biodisponibilité de l'OTA a été étudié chez les rats males (Sprague-Dawley). Les animaux ont été nourris avec des régimes contenant 1 ou 3 mg d'OTA /kg. Les régimes ont été enrichis avec 0,1 ; 1 et 5% de CHA. Les résultats ont montré que la CHA diminue la concentration d'OTA dans le plasma. L'excrétion de l'OTA et de ses métabolites (alpha ochratoxine, et ochratoxine A hydroxylé) dans la bile et l'urine a également été diminuée lors de l'addition de 5% CHA dans l'alimentation. Cela a été associé à une augmentation de l'excrétion de l'OTA dans les fèces (Madhyastha *et al.*, 1992). L'enzymurie et la morphologie rénale a révélé que les CHA alimentaires peuvent diminuer la néphrotoxicité induite par l'OTA, en réduisant l'exposition à la toxine rénale (Kerkadi *et al.*, 1998) suite à une diminution de la biodisponibilité et/ou la circulation entéro-hépatique de la toxine (Roth *et al.*, 1988).

## 1.2 Méthodes biologiques de décontamination

On entend par «décontamination biologique » la transformation enzymatique des mycotoxines en un composé moins toxique. Un nombre important d'organismes (bactéries, moisissures, champignons...) a montré une capacité à métaboliser des mycotoxines. Pour une revue générale, voir dans les articles (Bata *et al.*, 1999 ; Amézqueta *et al.*, 2009 ; Halász *et al.*, 2009 ; Reddy *et al.*, 2010 ; Kabab, 2010 ; Jard *et al.*, 2011).

### 1.2.1 Désactivation de l'OTA par transformation

La dégradation de l'OTA a été mise en évidence au cours du procédé d'ensilage : l'OTA présente sur l'orge est éliminée par la flore microbienne présente (Rotter *et al.*, 1990). L'OTA est aussi partiellement dégradée par les bactéries du rumen des vaches, ce qui rend ces animaux plus résistants aux mycotoxines que les animaux monogastriques.

L'OTA est hydrolysée en Ota et phénylalanine (figure 29) (Hult *et al.*, 1976) ou est estérifiée en OTC (Galtier & Alvinerie, 1976). L'*Eubacterium* BBSH797, bactérie isolée du rumen, a été caractérisée par Schatzmayr *et al.* (2005) pour son potentiel de dégradation de l'OTA en Ota. La capacité de dégradation de l'OTA en Ota par *Acinetobacter calcoaceticus*, également isolé à partir du rumen, a été mise en évidence *in vitro* sur milieu synthétique à 25 et 30°C (Hwang & Draughon, 1994).

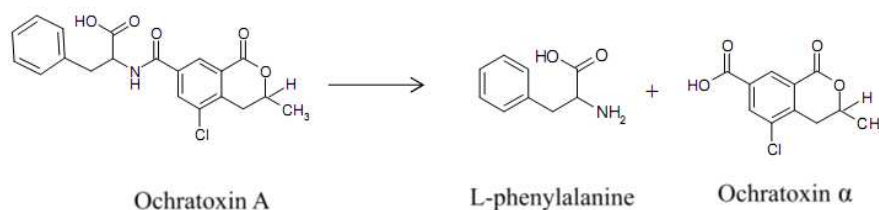


Figure 29 : Dégradation de l'OTA en phénylalanine et OT α (D'après Varga *et al.*, 2010)

La dégradation de l'OTA, en divers produits non identifiés, a été mise en évidence par des suspensions de cellules de blé, d'orge ou de maïs. Ces transformations enzymatiques incluent des réactions d'hydrolyse, de méthylation et d'hydroxylation qui conduisent parfois à une perte du potentiel toxique de la molécule (Ruhland *et al.*, 1994 ; 1996a, b). Une enzyme, isolée à partir d'*Aspergillus niger* dégrade l'OTA en OTa (Stander *et al.*, 2000).

D'autres activités enzymatiques, ainsi que d'autres microorganismes, ont été caractérisés pour leur potentiel de dégradation de l'OTA (tableau12). Pour une revue générale, voir l'article de Abrunhosa *et al.*, 2010 ; Varga *et al.*, 2010.

Tableau 12 : Transformation de l'OTA par différents microorganismes. (Adapté de Jard, 2009)

Souches utilisées	Produits observés	remarques	Références
Bactéries			
Bactéries isolées à partir du rumen <i>Actinobacter sp.</i>	OTa		Galtier & Alvinerie, 1976. Kiessling <i>et al.</i> , 1984. Hwang & Draughon, 1994.
<i>Phynelobacteriem immobile</i>	OTa.		Wegst & Lings, 1983
Bactéries lactiques	OTa	Acides de bactéries lactiques	Skinjar <i>et al.</i> , 1996  Fuchs <i>et al.</i> , 2008  Del Prete <i>et al.</i> , 2007
<i>Oenococcus oeni</i>		28% d'OTA adsorbée	
Moisissures			
<i>Aspergillus de la section Nigri</i> ( <i>niger</i> , <i>japonicus</i> , <i>carbonicus</i> )	OTa.	Plus de 80% de l'OTA dégradée	Abrunhosa <i>et al.</i> , 2002 et 2006 ; Stander <i>et al.</i> , 2000
<i>A.fumigatus</i>	OTa		Bejaoui <i>et al.</i> , 2006. Varga <i>et al.</i> , 2000.
<i>Rhizopus sp</i>		95% d'OTA dégradée en 7 jours	Varga <i>et al.</i> , 2005
<i>Aureobasidium pullulans</i>	OTa	Agent de bio contrôle efficace sur la vigne permettant une accumulation moindre de l'OTA dans le raisin et une diminution des symptômes de l'aspergillose.	De Felice <i>et al.</i> , 2008
<i>Penicillium</i>			Abrunhosa <i>et al.</i> , 2002
Levures			
<i>P.rhodozyma</i>	OTa		Péteri <i>et al.</i> , 2007
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	OTa		Cecchini <i>et al.</i> , 2006.  Bejaoui <i>et al.</i> , 2004. Angioni <i>et al.</i> , 2007  Styriak <i>et al.</i> , 2001. Meca <i>et al.</i> , 2010. Patharagan <i>et al.</i> , 2011
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	OTa	Transformation totale en 2,5h Ajout de cette levure peut contrecarrer les effets nocifs liés à l'OTA chez le poulet.	Molnar <i>et al.</i> , 2004. Schatzmayr <i>et al.</i> , 2002, 2003, 2006



### 1.2.2 Désactivation de ZEA par transformation

Plusieurs microorganismes comme des bactéries, des levures et des moisissures ont montré leur capacité à transformer la ZEA (voir tableau 13). Les métabolites produits sont représentés dans la figure 30.

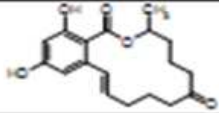
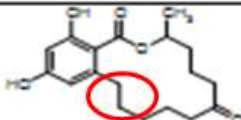
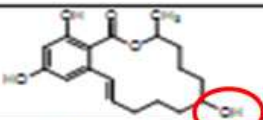
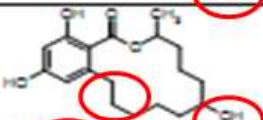
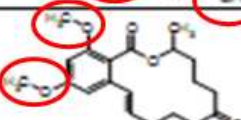
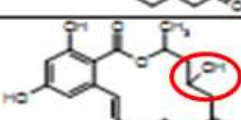
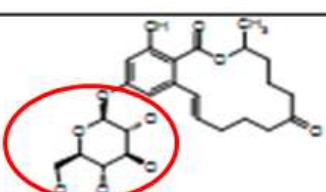
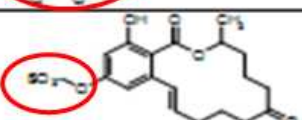
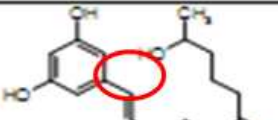
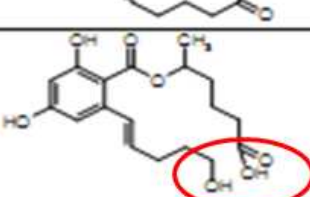
ZEA	
<u>Composé oxydé</u> Zéaralanone	
<u>Composés hydroxylés ou méthylés</u> $\alpha$ - $\beta$ zearalénol	
$\alpha$ - $\beta$ zearalanol	
Méthoxy-ZEA	
Hydroxy-ZEA	
<u>Glucuro ou sulfo-conjugués</u> ZEA-4- $\beta$ -glucopyranoside	
ZEA-4-sulfate	
<u>Composés hydrolysés</u> ZEA-décarboxylée	
ZEA-hydroxylée	

Figure 30 : Structures chimiques de différents métabolites de la ZEA (Adapté de Jard, 2009).

Tableau 13 : Transformation de la ZEA par différents microorganismes (Adapté de Jard, 2009)

Souches utilisées	Produits observés	remarques	Références
Bactéries			
Bactéries du rumen	$\alpha$ - $\beta$ zéaralénol		Kiessling <i>et al.</i> , 1984
Bactéries du sol <i>Bacillus sp</i>			Mortensen <i>et al.</i> , 2006 Edgar <i>et al.</i> , 2011. Yi <i>et al.</i> , 2011
<i>Acinobacter sp</i> (SM04)			Yu <i>et al.</i> , 2011
Bactéries intestinales du porc	Pas identifiés		Kollarezik <i>et al.</i> , 1994
<i>L.rhamnosus</i>		<i>In vitro</i> : Adsorption de 55% de pH 4 à pH 8 Inactivation à l'acide ou à la chaleur (76% d'adsorption) augmente l'efficacité d'adsorption par rapport aux bactéries viables (47%).	<i>In vitro</i> : El-Nezami <i>et al.</i> , 2002 Niderkorn <i>et al.</i> , 2006 El-Nezami <i>et al.</i> , 2002; 2004
<i>Pseudomonas sp</i>	Pas identifiés	Produit moins toxique que la ZEA. Enzyme codée par un plasmide	El-Deeb, 2005. Altaf et El-Deeb, 2009
Culture mixte de bactéries issues du sol	Pas identifiés		Megharaj <i>et al.</i> , 1997
Moisissures			
<i>Rhizopus sp</i>	ZEA -4- $\beta$ -glucopyranoside+ $\alpha$ - $\beta$ zéaralénol		Kamimura, 1986
<i>Thamnidium elegans</i> <i>Mucor bainieri</i>	ZEA glucoside		Sharkawy & Abul-Hajj, 1987a
<i>Cunninghamella bainieri</i>	Méthoxy-ZEA		El-Sharkawy & Abul-Hajj, 1987b
<i>A. ochraceus</i> <i>A. niger</i>	$\alpha$ - $\beta$ zearalanol		El-Sharkawy & Abul-Hajj, 1987b
<i>Penicillium rubrum</i> <i>Aspergillus quadrilineatus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Rhodotulora rubra</i> <i>Syncephalostrum elegans</i> <i>Chaetomium globosum</i>	$\alpha$ - $\beta$ zearalénol		McMullen, 1977
<i>Rhizopus sp</i>	ZEA-4-sulfate + $\alpha$ -zéaralénol	26% ZEA-sulfate 18% d' $\alpha$ -ZOL par rapport à ZEA initiale	<i>et al.</i> , 1991
<i>Fusarium sp.</i>	ZEA-4-sulfate	Toxicité plus faible que la ZEA par mesure de la taille d'utérus de rate	Plasencia & Mirocha, 1991
<i>Clonostachys rosea</i>	ZEA décarboxylée	Expression hétérologue du gène de lactonohydrolase <i>zhd-101</i>	El-Sharkawy & Abul-Hajj, 1988. Takahashi-Ando <i>et al.</i> , 2002. Kakeya <i>et al.</i> , 2002. Igawa <i>et al.</i> , 2007.
Actinomycètes			
<i>Streptomyces sp.</i>	ZEA-glucoside Hydroxy-ZEA		Kamimura, 1986 El-Sharkawy & Abul-Hajj, 1987b

<i>Rhodococcus sp.</i> <i>Nocardia sp.</i>	ZEA décarboxylée	Séquence protéique brevetée de la ZEA estérase pour insertion du gène dans plantes transgéniques	Duvick & Rood, 2000 Karlovsky <i>et al.</i> , 2003
Levures			
<i>S. cerevisiae</i>	Zearalanone  $\beta$ zéaralénol		El-Sharkawy & Abul-Hajj, 1987b Karlovsky, 1999
<i>Candida tropicalis</i> <i>Torulaspora delbrückii</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> <i>Saccharomyces sp.</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Candida sp.</i> <i>Hansenula sp.</i> <i>Brettanomyces sp.</i> <i>Schizosaccharomyces sp.</i> <i>Saccharomycopsis sp.</i>	$\alpha$ - $\beta$ zéaralénol  $\alpha$ -zéaralénol		Böswald <i>et al.</i> , 1995
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	Hydroxy-ZEA	Présente dans le produit Mycofix@plus (Biomim, Autriche)	Molnar <i>et al.</i> , 2004 Schatzmayr <i>et al.</i> , 2008. Vekiru <i>et al.</i> , 2009 et 2010

### 1.3 Composition de la paroi cellulaire des levures

Les parois de bactéries et des levures sont capables de se lier aux mycotoxines et de limiter ainsi leur biodisponibilité dans le tube digestif. Trois composants principaux constituent la paroi des levures: glucanes, mannanes et chitine.

La surface extérieure de la paroi cellulaire des levures est composée d'un mélange complexe d'hydrates de carbone qui contient du mannose et un mélange de mannose-protéines. Les surfaces intérieures contiennent des glucanes et autres glucides complexes.

Les mécanismes d'adsorption font appel à des liaisons hydrogène, ionique ou des interactions hydrophobes. La paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* représente environ 30% (p/p) du poids total de la cellule. La majorité des protéines de la paroi cellulaire (mannoprotéines) sont liée de manière covalente au  $\beta$ -1,3-glucane *via* les chaînes  $\beta$ -1,6-glucane (figure 31).

La structure squelettique est aussi renforcée par une faible quantité de chitine liée sur l'intérieur de celle-ci (Smits *et al.*, 1999; 2001).

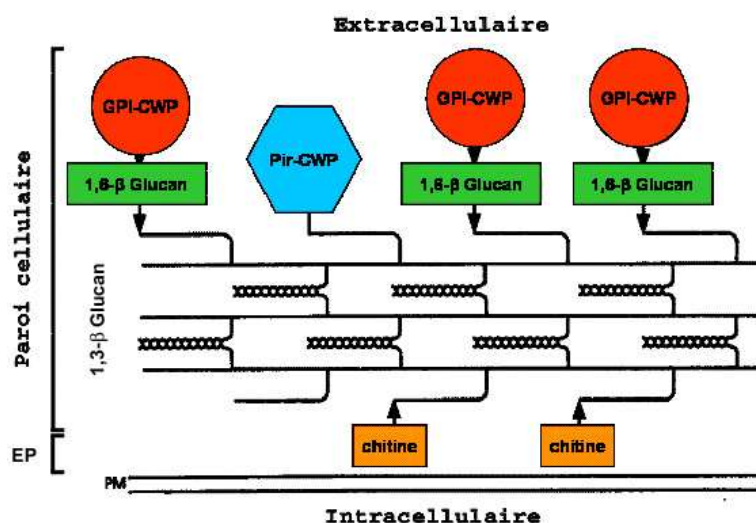


Figure 31 : Organisation moléculaire générale de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* (Smits *et al.*, 2001). EP : espace périplasmique, CWP : «cell wall proteins», mannoprotéines de la paroi cellulaire, Pir : «Proteins with internal repeats», mannoprotéines qui possèdent des séquences internes répétées, GPI : groupement glycosylphosphatidylinositol.

Une étude *in vitro* sur la cinétique de l'interaction entre plusieurs mycotoxines (AFB<sub>1</sub>, DON, patuline, et OTA) et les  $\beta$ -glucanes provenant de différentes sources à pH du tube digestif (3 ; 6 et 8) a été réalisée par l'équipe (Yiannikouris *et al.*, 2006). Les conditions acide et neutre donnent les taux d'affinité les plus élevés pour AFB<sub>1</sub>>DON>OTA et impliquent à la fois (1-3)  $\beta$ -glucanes et (1-6)-  $\beta$ -glucanes. Les conditions alcalines, en raison de leur action de destruction des glucanes, sont seulement favorables pour l'adsorption de la patuline (Yiannikouris *et al.*, 2006).

Raju et Devegowda (2000) ont montré que les mannanes peuvent lier l'ochratoxine A et la toxine T-2. Yiannikouris *et al.* (2003, 2004a, b, c) attribuent la liaison de la zéaralénone aux  $\beta$ -D-glucanes.

### 1.3.1 Désactivation de la ZEA par les levures et leurs parois

La structure macromoléculaire des  $\beta$ -glucanes joue un rôle déterminant dans l'efficacité de la fixation. En effet, une modélisation moléculaire a permis de visualiser la complémentarité géométrique, qui permet la molécule de zéaralénone de se loger à l'intérieur de la structure en hélice des  $\beta$ -glucanes pour former un complexe chimique (Yiannikouris *et al.*, 2004a) (figure 32).

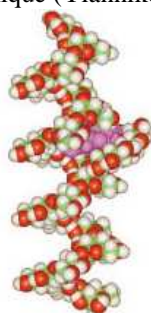


Figure 32 : Fixation de la Zéaralénone (en violet) dans l'hélice des glucanes de *Saccharomyces cerevisiae*. (D'après Yiannikouris *et al.*, 2004a)

L'étude de la stabilité de ces complexes en fonction du pH et d'échanges par dialyse a permis de montrer que les liaisons chimiques formées sont de nature électrostatiques *via* les groupes hydroxyle, lactone et cétone de la zéaralénone. Des liaisons de type van der Waals existent également entre les cycles aromatiques des toxines et les deux cycles de glucanes qui l'encadrent. Les complexes formés sont stables dans les conditions physico-chimiques normales du tube digestif (Yiannikouris *et al.*, 2004 b,c).

Yiannikouris *et al.* (2004d) ont évalué le rôle des  $\beta$ -D-glucanes dans l'adsorption de la zéaralénone à pH 3, 6, et 8 retrouvés dans le système digestif de l'homme. Les conditions acides et neutres ont donné la plus grande affinité (64-77%) par  $\beta$ -1,3-D-glucanes, tandis que les conditions alcalines diminuent l'adsorption. Les conditions alcalines semblent faire obstacle à la conformation tridimensionnelle de B-D-glucanes et de favoriser une hélice unique et/ou structure aléatoire (Yiannikouris *et al.*, 2004d).

Quatre souches de *Saccharomyces cerevisiae* avec différentes composition de parois en glucane et de mannane ont été comparées : la souche wt292 (type sauvage), fks1 (souche mutée, qui est déficiente en  $\beta$ -1,3-D-glucane synthétase), mnn9 (souche mutée, qui est déficiente du gène nécessaire à la N-glycosylation), la souche commerciale sc1026 (de Altech Inc). Les parois des souches wt292 et mnn9 riches en  $\beta$ -glucanes, ont été capables de complexer une concentration élevée de ZEA en comparaison aux souches fks1 et sc1026. La grande quantité de chitine dans les souches mnn9 et fsk1 augmente l'insolubilité des  $\beta$ -glucanes et diminue la flexibilité de ces parois cellulaires, ce qui limite l'accès de la ZEA aux sites des  $\beta$ -glucanes impliqués dans la formation du complexe (Yiannikouris *et al.*, 2004a). Il a été conclu que les interactions chimiques entre bêta-glucanes et la ZEA sont des liaisons faibles non covalentes (Yiannikouris *et al.*, 2004e).

### 1.3.2 Désactivation de l'OTA par les levures et leurs parois

Le fait que l'adsorption des ochratoxines soit renforcée lorsque des cellules de levure sont remplacées par les extraits de parois cellulaires (Huwig *et al.* 2001), ou des cellules traitées thermiquement (Bejaoui *et al.*, 2004) indique la nature physique de l'adsorption de l'OTA (Shetty & Jespersen, 2006).

Les parois de levure fixent, en fonction de leurs caractéristiques chimiques, d'avantage certaines mycotoxines que d'autres. De plus, un effet dose a été mis en évidence: plus il y a de mycotoxines, plus il faut de ligands (parois de levures).

Plusieurs modèles existent (Hill's, Freundlich et Brunauer-Emmett-Teller, Langmuir,...) pour l'interprétation biologique du phénomène d'adsorption. Pour décrire le phénomène en entier, il faut prendre en compte tous les paramètres.

La biosorption de l'ochratoxine A (OTA) sur trois produits dérivés de levure: sous produits du vin contenant des parois de levure (EX16), beta-glucane purifiée de levure (BETA) et la paroi de levure (LEC), a été étudié *in vitro* en fonction de la température de 4 à 37°C (Ringot *et al.*, 2005). Cette recherche avait pour but d'accroître la compréhension des mécanismes d'adsorption de l'ochratoxine A sur les produits dérivés de levure, en se basant sur des paramètres thermodynamiques. La paroi cellulaire de levure sèche (LEC) s'est révélée la plus efficace pour l'adsorption de l'OTA. Les meilleurs modèles de biosorption de l'OTA par EX16, BETA et LEC ont été identifiés comme étant, respectivement, Hill's, Freundlich et Brunauer-Emmett-Teller (Ringot *et al.*, 2005). Pour les produits BETA et EX16, il a été observé une diminution de l'interface solide/solution, alors que pour LEC, les paramètres thermodynamiques suggère des interactions hydrophobes (Ringot *et al.*, 2006).

#### 1.3.2.1 Désactivation de l'OTA par *Saccharomyces cerevisiae*

Des poulets de chair ont reçu dans leur alimentation 5ppb d'OTA en présence ou en absence de parois de levures de *Saccharomyces cerevisiae* CWSC (0,01%). Les paramètres mesurés sont le la prise alimentaire, le gain de poids, le poids relatif du foie, du rein et de la bourse de Fabricus. L'OTA seule a provoqué des effets négatifs sur la prise alimentaire et le gain de poids. Ni l'OTA, ni la levure n'a d'effet sur le poids relatif des organes. La levure n'a pas amélioré l'effet de l'OTA sur le gain de poids (Santin *et al.*, 2003).

L'effet protecteur des levures séchées de *Saccharomyces cerevisiae* (3 g/kg d'aliment) et/ou la vitamine C (300 mg/kg d'aliment) a été testé vis-à-vis de l'OTA (200 ppb) sur les poulets de chair. L'OTA a provoqué une diminution significative du poids corporel et la consommation d'aliment. Une augmentation significative du poids relatif des organes (rein, foie, gésier, proventricule) et du taux de mortalité. La supplémentation avec la levure soit seule ou en combinaison avec la vitamine C a atténué les effets toxiques de l'OTA. La vitamine C seule n'a pas empêché les effets négatifs d'OTA observées dans les poussins (El Barkouky *et al.*, 2010).

Blank et Wolfram (2009) ont montré que l'ajout dans l'alimentation de levures (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077, Lallemand SA, Toulouse, France) vivantes, améliore les performances zootechniques, chez les moutons mais n'a aucune incidence sur la toxicocinétique de l'OTA. Par contre dans une autre étude, des poules pondeuses ont été nourries avec une alimentation contaminée en OTA (0,2 ppm) et supplémentation en *Saccharomyces cerevisiae* (0,2%) durant 12 semaines. Les levures n'ont pas d'effet particulier sur l'adsorption de l'OTA. L'OTA a été retrouvée en quantité faible dans l'ordre décroissant dans rein>sang>muscle (Zaghini *et al.*, 2007).

#### 1.3.2.2 Désactivation de l'OTA par *Trichosporon spp*

Une étude menée sur des poulets a révélé que l'influence négative des doses élevées d'ochratoxine sur la performance des poulets de chair pouvait être neutralisée par l'addition de *Trichosporon spp*. Le poids final du groupe recevant 1 ppm d'OTA (mg/kg d'aliment) et de la levure ( $10^5$  CFU par gramme de nourriture) a été en moyenne de 61 grammes plus élevé que le groupe ayant reçu 1ppm d'OTA sans la levure (Schatzmayr *et al.*, 2004).

La levure *Trichosporon mycotoxinivorans* apporté par l'alimentation a complètement bloqué la suppression immunitaire induite par l'OTA chez des poussins de chair (Kabab *et al.*, 2010).

### 1.3.2.3 Désactivation de l'OTA dans les vins par différentes levures

Les souches œnologiques de *Saccharomyces cerevisiae*, ont la capacité d'éliminer l'OTA contaminant fréquemment retrouvé dans le vin. L'adsorption des mycotoxines par les levures a été mise en évidence par l'utilisation d'un mélange de levure stérilisée et de résidus de fermentation de la bière : le mécanisme expliquant la disparition de l'OTA *in vitro* suppose l'adsorption de l'OTA sur la paroi des levures. Les cellules *Saccharomyces cerevisiae*, traitées thermiquement ont montré une adsorption de 90% (p/p) par rapport aux cellules viables (35% p/p) indiquant la nature physique de la liaison et le rôle important de la densité cellulaire dans l'efficacité d'adsorption. Ces levures mortes peuvent potentiellement être utilisées pour éliminer l'OTA à partir de jus de raisin (Bejaoui *et al.*, 2004). De plus, l'utilisation de ces levures vivantes, ou mortes, n'entraîne pas de modifications de la qualité du vin. Ce procédé est donc prometteur pour la décontamination de l'OTA dans le vin.

L'équipe de Cecchini *et al.* (2006) a examiné si les souches de levures (*Saccharomyces cerevisiae* (Scer), *Saccharomyces cerevisiae bayanus* (Suva), *Saccharomyces bayanus* (Sbay), *Kloeckera apiculata* (Kl), *Torulaspora delbrueckii* (T), *Schizosaccharomyces pombe* (Schp), *Candida pulcherrima* (C) et *Saccharomycodes ludwigii* (Slud)), responsables de la fermentation alcoolique, pouvaient avoir une influence sur la concentration de l'OTA dans le vin blanc et rouge.

Avant la fermentation, l'OTA a été ajoutée aux moûts jusqu'à une concentration de 2mg/l. L'OTA a été déterminée dans le vin blanc et rouge résultant des moûts et de l'extrait méthanolique de la levure liés (MEL). Les données ont montré une réduction significative de l'OTA à la fin de la fermentation alcoolique. Cependant, selon la souche de levure impliquée dans la fermentation, il y a une différence dans la teneur en OTA dans les vins. Le pourcentage d'OTA qui disparaît lors de la fermentation oscille entre 46,83 % et 52,16 % dans le vin blanc et entre 53,21 % et 70,13 % dans le vin rouge (figure 33). L'absence de produits de dégradation propose un mécanisme d'adsorption. (Cecchini *et al.*, 2006).

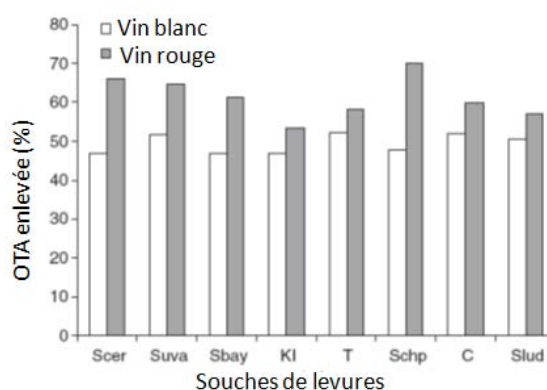


Figure 33 : Pourcentage des valeurs d'OTA dégradé par les levures à la fin de la fermentation dans le vin blanc et rouge (Cecchini *et al.*, 2006).

Var *et al.* (2009) ont étudié la capacité d'adsorption d'OTA de plusieurs souches de levure (*Candida*, *Kloeckera*, *Rhodotorula* et *Cryptococcus*) isolées de raisins turques. Les cellules viables et traitées thermiquement ont été incubées avec l'OTA (10ng/ml) dans le vin blanc ou un tampon à pH3 (PBS) à 25°C pendant 4h. Le taux d'OTA a été mesuré dans le surnageant après centrifugation. Le taux d'adsorption des cellules viables variait de 1,96 à 26,11 % dans le PBS et de 4,75 à 21,40 % dans le vin blanc. Avec les cellules traitées thermiquement, le taux d'adsorption allait de 4,10 à 31,31% dans le PBS et de 8,08 à 30,45 % dans le vin blanc (Var *et al.*, 2009).

La viabilité des levures n'est pas nécessaire pour l'adsorption de l'OTA (Var *et al.*, 2009 ; Bizaj *et al.*, 2009).

Une vingtaine de levures de *Saccharomyces cerevisiae* et *Kloeckera apiculata* ( $10^7$  cellules/ml) pendant la fermentation alcoolique ont été étudiées en présence d'OTA (0,2 ; 0,6 ; 3 et 6µg/l). Il a été noté que la présence d'OTA n'affecte pas le processus de fermentation alcoolique. Certaines levures ont permis la réduction d'OTA. L'absence de résidus d'OTA dans la biomasse exclue un effet adsorbant sur les parois levure des souches testées, et l'absence d'OTa et de phénylalanine suggère d'autres voies de dégradation de l'OTA par les levures (Angioni *et al.*, 2007).



### 1.3.2.4 Désactivation de l'OTA par la levure *Phaffia rhodozyma*

La souche *P.rhodozyma* CBS 5905 dégrade plus de 90% d'OTA en 15 jours à 20°C. Les données indiquent que les *P. rhodozyma* sont capables de convertir l'OTA en OT $\alpha$  (Peteri *et al.*, 2007). Les agents chélateurs tels que l'EDTA et 1,10-phénanthroline inhibent la dégradation de l'OTA provoquée par *P.rhodozyma*. Ceci indiquant que la carboxypeptidase impliquée est une métalloprotéase, similaire à la carboxypeptidase A. La température optimale de cette enzyme se situe au-dessus de 30 °C, ce qui est beaucoup plus élevée que la température optimale de croissance de *P.rhodozyma*, qui est d'environ 20°C.

De plus, qu'elles soient viables ou après un traitement thermique (mortes), les cellules de *P.rhodozyma* sont également en mesure d'adsorber des quantités importantes (jusqu'à 250 ng/ml) d'OTA. Le traitement thermique renforce les activités d'adsorption d'OTA par les cellules. Il a été conclu que la souche *P. rhodozyma* CBS 5905 est capable de détoxifier l'OTA par transformation et par adsorption (Peteri *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Désactivation de ZEA, OTA par différentes souches de levures

Plusieurs levures ont été testées par l'équipe de Bakutisi (2005) pour leur capacité de réduire le taux des mycotoxines (ZEA, OTA, AF et DON) des graines de tournesol, du maïs et des fourrages. Des échantillons de graines de tournesol, et de maïs, ont été inoculés avec *Saccharomycopsis capsularis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Geotrichum fermentans*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis*, *Metschnikowia pulcherima*, *Kluyveromyces marxianus* pendant 10 jours à 28±2°C. L'analyse des mycotoxines a été réalisée avant et après l'ajout de l'inoculum.

La levure *Rhodotorula rubra* permet la réduction totale de la ZEA (de 2 à 0mg/kg) (figure 34 graphe de gauche) dans les graines de tournesol (Bakutisi *et al.*, 2005). Les auteurs ne précisent pas s'il s'agit d'une adsorption ou une transformation.

Dans le maïs de fourrage, la levure *Rhodotorula glutinis* réduit de 93,2% (de 0,22 à 0,015 mg/kg) la zéaralénone (figure 34 graphe de droite). Cette levure (*Rhodotorula glutinis*) augmente de taux d'OTA de 0,0047 à 0,0059 mg/kg, soit une augmentation de 20,3% dans le maïs (figure 34 graphe de droite).

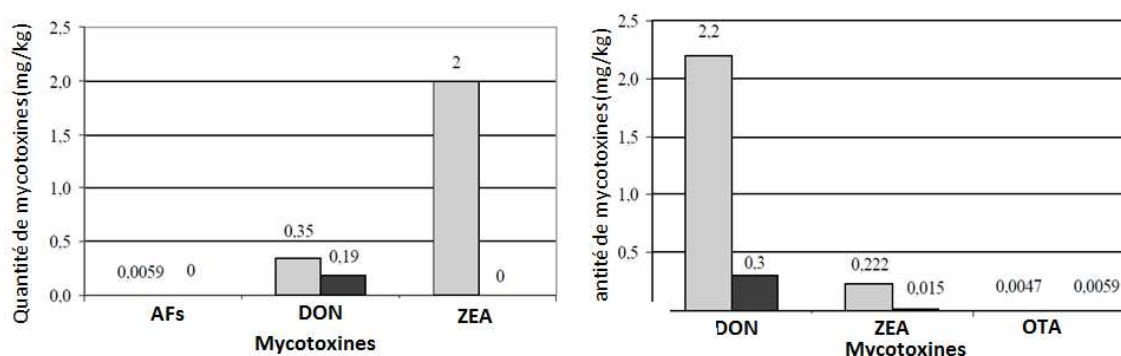


Figure 34 : Taux de mycotoxines (mg/kg) avant et après 10 jours culture de levures *Rhodotorula rubra* dans les graines de tournesol (à gauche) et *Rhodotorula glutinis* dans le maïs (à droite) (Bakutisi *et al.*, 2005).

La levure *Geotrichum fermentans* réduit la ZEA de 45% (de 0,20 à 0,11 mg/kg), dans les fourrages (figure 35 graphe de gauche). La levure *Kluyveromyces marxianus* de réduire le taux de ZEA de 0,25 à 0,14 mg/kg (figure 35 graphe de droite) (Bakutisi *et al.*, 2005).

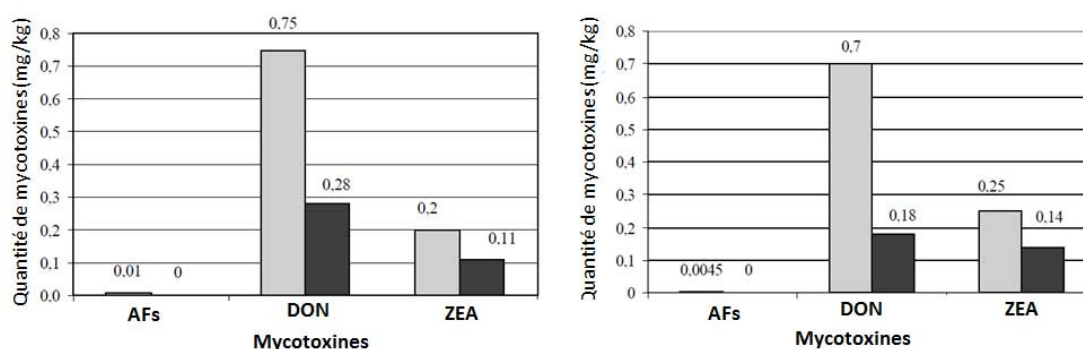


Figure 35 : Taux de mycotoxines (mg/kg) avant et après 10 jours culture de levures *Geotrichum fermentans* (à gauche) et de *Kluyveromyces marxianus* (à droite) dans les composés de fourrage (Bakutisi et al., 2005).

### 1.3.4 Désactivation de l'AFB<sub>1</sub> par *Saccharomyces cerevisiae*

La liaison de l'AFB<sub>1</sub> à la levure *S. cerevisiae* (SC) semble être un phénomène physique. La liaison était 2 fois plus importante lorsque les cellules ont été traitées à 120°C pendant 20min en comparaison à celles traitées à 52, 55 et 60 °C pendant 5 et 10 min. De même, lorsque les cellules sont traitées avec du HCl (2M) pendant 1h, la liaison est jusqu'à 2 fois plus importante. Les résultats obtenus montrent que certaines souches de *S.cerevisiae*, viables ou non viables, se lient efficacement à l'AFB<sub>1</sub> (Shetty et al., 2007).

Les levures vivantes (*S. cerevisiae*) ont été utilisées comme un promoteur de performances dans l'industrie de la volaille à partir des années 1990. L'effet bénéfique sur le gain de poids et la réponse immunitaire chez les poulets de chair exposés à l'aflatoxine (Kabab et al., 2010) a été constaté. *S. cerevisiae* améliore le gain de poids et diminuent les effets génotoxiques produits par l'AFB<sub>1</sub> chez les souris (Kabab et al., 2010).

Zaghini (2005a) et son équipe ont mesuré les quantités d'AFB<sub>1</sub> et d'AFM<sub>1</sub> dans les tissus (foie, rein, muscle et graisse) de porc nourris pendant 5 semaines avec de l'AFB<sub>1</sub> (280 µg/kg d'aliment) et 0,2 % de levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ni l'AFB<sub>1</sub>, ni l'AFM<sub>1</sub> n'ont été retrouvées dans le muscle et la graisse des animaux traités avec l'AFB<sub>1</sub> et la levure. Dans le foie et le rein des animaux ayant reçu de l'AFB<sub>1</sub> et/ou la levure des quantités faibles ont été retrouvées en AFB<sub>1</sub> (0,03 ppb dans le rein ; 0,12 ppb dans le foie) et en AFM<sub>1</sub> (0,48 ppb dans le rein et 0,54 ppb dans le foie), ces quantités sont similaires entre le groupe témoin (AFB<sub>1</sub> seule) et le groupe ayant reçu de l'AFB<sub>1</sub> et la levure. Ces résultats confirment la faible capacité des levures à fixer d'AFB<sub>1</sub> et AFM<sub>1</sub>. Ces données sont en accord avec d'autres travaux (Stubblefield et al., 1991; Rizzi et al., 2003a).

Une étude récente réalisée *in vitro* a permis de sélectionner 2 souches de *S.cerevisiae* (RC016 et RC008) pour leur capacité à se lier avec l'AFB<sub>1</sub> (50, 100 et 500ng/ml) et à résister aux conditions du tractus gastro-intestinal ainsi qu'à inhiber la croissance des bactéries pathogènes (*E.coli*, *Enterobacter cloacae* et *Salmonella enterica sub sp*) (Armondo et al., 2011 ; Pizzolitto et al., 2011). Ces deux souches de RC008 RC016 augmentent la digestibilité des fibres dans le tractus gastro-intestinal car elle stimule le développement des bactéries celluloliques dans le fluide ruminal (Dogi et al., 2011). Le potentiel de *S. cerevisiae* à réduire la toxicité des aflatoxines a été évalué chez les souris (Swiss Albino). Les souris ingérant de l'AFB<sub>1</sub> (0,7 mg/kg pc), prennent moins de poids, et voit leur taux sériques d'ALAT (alanine aminotransférase), d'ASAT (aspartate aminotransférase), d'acide urique et de créatinine augmenter. Les niveaux d'antioxydants non enzymatiques (GSH), et enzymatiques (SOD : superoxyde dismutase) diminuent significativement dans le foie et les reins des souris traitées avec l'AF en comparaison au témoin. Les examens histopathologiques ont montré de graves dommages dans le foie et les reins des souris traitées avec les AFs. Une nette amélioration tant concernant les paramètres biochimiques sériques qu'au niveau des dommages hépatiques et rénaux est observée chez les souris ayant reçu les levures ( $4 \times 10^8$  UFC), 2h avant le gavage avec l'AFB<sub>1</sub>. Il y a aussi restauration du taux de GSH et des activités antioxydante comme la SOD (Tawfek et al., 2011). Les levures *S.cerevisiae* (0,2%) ont un effet protecteur contre l'AFB<sub>1</sub> (200µg), sur le gain de poids, la prise alimentaire, et les paramètres biochimiques (glutamique-oxalacetique transaminase (SGOT),



alkaline phosphatase (ALK.P) chez les cailles japonaises (Çelik *et al.*, 2001). *Saccharomyces cerevisiae* et *Rhizopus oligosporus* permettent la réduction de la croissance d'*Aspergillus flavus* (champignon producteur d'AFB<sub>1</sub>) et le taux d'AFB<sub>1</sub> dans des aliments de poulets. La réduction de la quantité d'AFB<sub>1</sub> est due soit à l'activité de *Saccharomyces cerevisiae* à inhiber la croissance du champignon producteur, soit à l'adsorption de la toxine. En ce qui concerne le *Rhizopus oligosporus*, cette réduction est le résultat de l'inhibition de la synthèse de l'AFB<sub>1</sub> ou à sa dégradation. L'effet des deux microorganismes testés dans cette étude sur la réduction du taux d'AFB<sub>1</sub> n'est pas significativement différents. Par contre, l'effet individuel de chaque microorganisme sur la réduction de l'AFB<sub>1</sub> est meilleur que l'effet de la combinaison des deux (Kusumaningtyas *et al.*, 2006).

Chez des poussins ayant reçu dans leur alimentation de l'AFB<sub>1</sub> (100, 200 et 300ppb) et 1% de boues de levure (sous-produit de l'industrie d'alcool), on note une amélioration significative des valeurs biochimiques (protéines sériques totales, albumine sérique et l'activité ALAT), elle diminue le pourcentage de mortalité, par contre il n'y a pas d'impact sur les paramètres immunitaires ni sur la prise alimentaire, ni le gain de poids. Il a été observé que 1% des boues de levure adsorbent l'AFB<sub>1</sub> efficacement à 100 et 200 ppb, mais l'efficacité est moindre à 300 ppb d'AFB<sub>1</sub>. (Hashmi *et al.*, 2006).

### 1.3.5 Adsorption de l'OTA et l'AFB<sub>1</sub> par les parois de *Saccharomyces cerevisiae*

La paroi cellulaire peut fixer les mycotoxines *in vitro*, mais il y a peu d'informations sur le fait que cette adsorption puisse diminuer l'absorption des mycotoxines *in vivo*. L'effet de paroi de levures (*Saccharomyces cerevisiae* 1026, Alltech, Inc) sur la toxicocinétique et l'excrétion (urine et fèces) de l'AFB<sub>1</sub> (0,716 µg/kg pc et 18,12 µg/kg pc) et l'OTA (3,22 µg/kg pc) a été testé chez le rat (Sprague–Dawley) après administration orale de chaque toxine. La co-administration d'AFB<sub>1</sub> et des parois de levures ne diminue pas le taux d'absorption. Par contre l'excrétion de l'AFB<sub>1</sub> dans les fèces a augmenté jusqu'à 55% par rapport au témoin sans levures, tandis que l'excrétion urinaire a diminué. De même, ces parois de levures ont permis de diminuer l'absorption de l'AFB<sub>1</sub>, et d'augmenter son excrétion dans les fèces jusqu'à 156% chez les brebis laitières (Firmin *et al.*, 2011).

L'effet des levures sur l'OTA est moins marqué bien que l'excrétion fécale augmente de 16%, il n'y a par contre pas de changements de l'élimination urinaire d'OTA. L'effet *in vivo* est en accord avec la capacité d'adsorption des mycotoxines (AFB<sub>1</sub> et OTA) sur les parois de levures *in vitro* (Firmin *et al.*, 2010).

### 1.3.6 Adsorption des mycotoxines par les glucomannanes de *Saccharomyces cerevisiae*

Les glucomannanes extraits des parois cellulaires de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de se lier à certaines mycotoxines (tableau 14). Leur capacité de liaison résulte de la large surface d'échange. Ainsi 500g de glucomannanes des parois cellulaires de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont la même capacité d'adsorption que 8 kg d'argile (Yannikouris & Jouany, 2002).

Tableau 14 : Capacité des glucomannanes issues de *Saccharomyces cerevisiae* d'adsorber les mycotoxines (adapté de Yannikouris & Joauany, 2002).

Mycotoxines	AF	FB	ZEA	T-2	CIT	DON	OTA	Nivalénol
Adsorption (%)	95	67	77	33,4	18,4	12,6	12,5	8,2

Les glucomannanes ont montré une capacité de liaison avec la ZEA et de la FB<sub>1</sub>, mais très peu avec le DON. Une étude a été menée par Raju et Devegoda (2000) pour évaluer les effets individuels et combinés des aflatoxines (0 à 0,3 mg/kg), de l'OTA (0 à 2 mg/kg) et de la toxine T-2 (0 à 3 mg/kg) sur la performance des animaux, la morphologie des organes, la biochimie et d'hématologie de 960 poulets de chair âgés de 1 à 35 jours et l'efficacité des glucomannanes estérifiés (dérivé de paroi de *Saccharomyces cerevisiae* 1026). Le poids corporel et la consommation alimentaire ont diminué suite à l'ingestion de l'ensemble des mycotoxines, l'OTA étant la plus toxique en début de vie. La teneur en cholestérol sérique a diminué alors que l'activité sérique de la  $\gamma$ GT est augmentée par l'AF et l'OTA. Ces effets sont plus prononcés chez les poussins de 21 que 35 jours. L'ingestion simultanée

des trois mycotoxines n'a pas montré une toxicité accrue comparée à l'ingestion des mycotoxines deux par deux. Les glucomannanes estérifiés ont permis l'augmentation du poids corporel (2,26%) et de l'apport alimentaire (1,6%) accompagnés d'une diminution du poids du foie (32,5%) et des glandes surrénales (18,9%), l'activité de la  $\gamma$ GT sérique est augmentée de 8,7%, les protéines sériques augmentent de 14,7%, le taux de cholestérol de 21,9%, et l'hémoglobine de 3,% (Raju & Devegowda, 2000). Une autre étude confirme également les effets protecteurs de la glucomannane de levure contre l'aflatoxicose dans les poulets de chair (Karaman, *et al.*, 2005 ; Shetty & Jespersen, 2006).

L'efficacité de la levure de glucomannane (Mycosorb<sup>®</sup>), incorporée dans l'alimentation à raison de 0,5 et 1g/kg, a été évaluée sur les effets néfastes de 2 mg d'aflatoxines/kg d'aliment sur les poussins de chair en croissance âgés de 1 à 21 jours. Le traitement par les aflatoxines a causé des changements dans les hépatocytes du foie et de l'épithélium tubulaire des reins, avec épuisement folliculaire dans la bourse de Fabricius, le thymus et la rate. La rate a été agrandie et congestionnée alors que le thymus a été atrophié. La levure glucomannane ajoutée à l'alimentation a réduit la gravité des changements pathologiques provoquée par l'AF. Le nombre d'organes affectés a également été réduit dans le groupe recevant 1g/kg de levures glucomannanes. Ces résultats montrent que la levure glucomannane a diminué les effets négatifs de l'aflatoxine sur les changements pathologiques et que la concentration la plus élevée de la levure glucomannane (1g/kg) était plus efficace que la concentration de 0,5 g/kg. La levure en elle-même n'avait aucun effet négatif (Karaman *et al.*, 2005).

Rizzi *et al.* (2003b) ont évalué l'effet des glucomannanes estérifiés (0,11% Mycosorb, Alltech Inc) sur les poules pondeuses exposées *via* leur alimentation à diverses mycotoxines (0,893 ppm AB<sub>1</sub> ; 10,36 ppm ZEA et 0,171 ppm FB<sub>1</sub>). Ces 3 mycotoxines n'ont été retrouvées ni dans le foie ni dans les excréments des animaux, ni dans les œufs. Ces toxines sont excrétées sous forme de métabolites et ne sont pas facilement transférées dans les œufs ni accumulées dans les tissus (Rizzi *et al.*, 2003b). Les mannanoligosaccharides (0,11%) adsorbent l'AFB<sub>1</sub> (2,5 ppm), en réduisant son absorption dans le tractus intestinal des poules pondeuses. Ni l'AFB<sub>1</sub>, ni l'AFM<sub>1</sub> ne sont retrouvées dans les œufs et le foie des animaux (Zaghini *et al.*, 2005b).

Chez des rats ayant ingérés de manooligosaccharides de levure sèche, les dommages induits par l'AF n'ont pas été réduits de manière significative (Baptista *et al.*, 2004). Ceci est contraire aux résultats de Devegowda *et al.* (1996). Les glucomannanes estérifiés n'ont pas d'effet contre le DON (Dänicke *et al.*, 2007).

### **1.3.7 Capacité de liaison des mycotoxines par *S. cerevisiae* ou des bactéries lactiques dans le tractus gastro-intestinal**

L'application potentielle de *S. cerevisiae* et les bactéries lactiques (LAB) pour lier des mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale dépend de la stabilité du complexe dans le tractus gastro-intestinal et la résistance du complexe dans le temps.

L'adhésion des microorganismes pro-biotiques à la muqueuse intestinale est considérée comme importante pour de nombreux effets sur la santé. *S. cerevisiae* montrent généralement une très faible capacité d'adhésion à la muqueuse de l'intestin, alors que les bactéries lactiques s'adhèrent de manière importante à l'intestin (Shetty & Jespersen, 2006). Les cellules de *S. cerevisiae*, sont capables de résister à l'environnement sévère du tractus gastro-intestinal mais certaines souches sont éliminées du système très rapidement (Shetty & Jespersen, 2006).

L'alimentation des animaux (volailles) d'expériences avec la levure entière ou avec la paroi cellulaire ont montré que l'ajout de *S. cerevisiae* dans le régime alimentaire a entraîné une réduction de la toxicité de l'AFB<sub>1</sub>. Il a été suggéré que le complexe levure-mycotoxine formé semble stable à travers le tractus gastro-intestinal. (Shetty & Jespersen, 2006).

Kankaanpää *et al.* (2000) ont étudié l'effet de l'aflatoxine B<sub>1</sub> sur la capacité d'adhérence de la souche *Lactobacillus rhamnosus* GG dans l'intestin en utilisant le modèle cellulaire Caco-2. La présence d'AFB<sub>1</sub> réduit la capacité d'adhérence de la souche *L. rhamnosus* GG de 30% à 5%. Les aflatoxines peuvent influencer les propriétés d'adhérence des probiotiques capables de les supprimer. Ces bactéries une fois libérées dans l'intestin adsorbent l'aflatoxine, et donc par conséquent peuvent réduire l'accumulation d'aflatoxines dans l'intestin suite à une excrétion accrue du complexe bactéries-aflatoxines. Une étude similaire (Gratz *et al.*, 2004) a montré que la pré-exposition des cellules de *L.*

*rhamnosus* GG à l'AFB<sub>1</sub> réduit sa liaison avec la muqueuse intestinale, résultant de l'élimination plus rapide par voie fécale. Ces données suggèrent que, en augmentant l'excrétion d'aflatoxine par voie fécale, les pro-biotiques empêchent la perte de poids des animaux et réduisent les effets hépatotoxiques causés par l'AFB<sub>1</sub> sur les rats.

La capacité des souches de *Lactobacillus rhamnosus* GG et LC-705 pour éliminer l'AFB<sub>1</sub> du milieu liquide luminal intestinal a été testé *in vivo* au niveau du duodénum de poulet. Dans cette étude, la souche de *L. rhamnosus* GG réduit la concentration d'AFB<sub>1</sub> de 54% dans la fraction soluble du fluide luminal en 1 min. Cette souche a été plus efficace par rapport à la souche *L. rhamnosus* LC-705 ( $P < 0,05$ ), qui a supprimé 44% d'AFB<sub>1</sub> dans des conditions similaires.

Dans le cas de *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS et *L. rhamnosus* LC-705, la réduction de l'adsorption de l'AFB<sub>1</sub> est de 63% et 37% respectivement. Les complexes formés *in vitro* entre soit *L. rhamnosus* GG ou *L. rhamnosus* LC-705 et AFB<sub>1</sub> étaient stables dans les conditions luminales pour une période de 1 heure (El-Nezami *et al.*, 2000).

La souche *Lactobacillus rhamnosus* GG en plus de réduire la disponibilité d'AFB<sub>1</sub>, protège contre les dommages membranaires et les fragmentations de l'ADN provoqués par l'AFB<sub>1</sub> dans le modèle cellulaire Caco-2 (Gratz, 2007).

Pizzolitto *et al.* (2011) ont comparé *in vitro* l'efficacité d'adsorption de l'AFB<sub>1</sub> entre les bactéries lactiques et *Saccharomyces cerevisiae*. Les levures *Saccharomyces cerevisiae* présentent une meilleure capacité d'adsorption de l'AFB<sub>1</sub> que les bactéries lactiques (Pizzolitto *et al.*, 2011). La levure *Saccharomyces cerevisiae* fait intervenir essentiellement les glucommannanes (Karaman *et al.*, 2005), pour les bactéries lactiques, les peptidoglucanes qui en sont responsables (Pizzolitto *et al.*, 2011).

## 1.4 Les études comparatives des différents adsorbants du commerce

### 1.4.1 Comparaison d'adsorption de ZEA par plusieurs adsorbants commerciaux

Les études concernant les adsorbants commerciaux se contredisent, certaines démontrent leur efficacité, d'autres mettent en question l'efficacité d'adsorption.

Une étude *in vitro* a été réalisée en 2004 par l'équipe de Döll pour comparer l'efficacité de détoxification de ZEA (1mg/kg) et du DON (10mg/kg) par plusieurs substances adsorbantes commerciales (tableau 15) et de laboratoire à savoir le charbon actif, la cholestyramine, la bentonite, l'aluminosilicate modifié, Toxisorb®, Mycosorb® Extra, Klinosan®, Mycofix®, Fix-A-Tox® et Likrattox® en utilisant un ratio de 1 : 10 : 2500 (ZEA/DON/adsorbant testé) à différents pH (3, 4, 5 et 7) afin de respecter la variation du pH entre l'estomac et l'intestin dans le tube digestif des porcs. Le temps d'incubation a été fixé à 10h couvrant le processus de digestion.

Dans un tube, les toxines sont mises en contact avec l'adsorbant dans un tampon (pH5) pendant 2h à 37°C. Le pH est ensuite ajusté à pH3 par addition de 300µl d'acide orthophosphorique. Le tube est de nouveau incubé pendant 2h. Après 4h d'incubation simulant les conditions de l'estomac, le pH est ajusté à pH6 par addition de 600µl de NaOH (12M) mimant les conditions de l'intestin. Le tube est à nouveau incubé pendant 3h. La dernière étape est d'ajuster le pH à 7 par l'ajout de 400µl de NaOH (12M) et d'incuber pendant 3h. Les échantillons sont séparés par centrifugation (2100g) pendant 10min. Le surnageant est utilisé pour l'analyse des toxines. Pour chaque adsorbant 4 répétitions ont été réalisées.

Afin de mesurer l'effet d'adsorption sous les conditions de pH de l'estomac, la réaction est arrêtée après 2h d'incubation à pH5 puis à pH3.

La quantité de ZEA restante dans le surnageant est mesurée. La quantité de toxine adsorbée ou dégradée est calculée par la différence de concentration entre le témoin (tampon seul) et dans le surnageant de chaque test, puis exprimée en pourcentage de toxine adsorbée.

Tableau 15: Composition et mode d'action des adsorbants commerciaux (Döll et al., 2004)

Produit	Composition	Mode d'action supposé	origine
charbon actif		Adsorption	Merck KgaA, Darmstadt, Allemagne
cholestyramine		Adsorption	Sigma, St.Louis, MO, USA
bentonite		Adsorption	Sigma, St.Louis, MO, USA
aluminosilicate modifié	Mélange de bentonite et montmorillonite (produit d'essai)	Adsorption	Sud-chemie AG, Moosburg Allemagne
Toxisorb®	mélange de bentonite et montmorillonite, partiellement modifié	Adsorption	Sud-chemie AG, Moosburg Allemagne
Mycosorb® Extra	glucomanane estérifié issu de la paroi de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Adsorption	Altech GmbH, Bad Segeberg, Allemagne
Klinosan®	mélange de zéolites et extrait de levure contenant une grande concentration de nucléotides	Adsorption	Unipoint AG, Truttikon Suisse
Mycofix®,	un adsorbant et un mélange enzymatique	Adsorption des mycotoxines polaires et dégrade enzymatiquement les tricothécènes et la ZEA.	Biomin GmbH, Herzogenburg, Austria
Fix-A-Tox®	Aluminosilicate	Adsorption	Alvetra und Werfft AG, Wien, Austria
Likrattox®	Adsorbant et enzyme	Adsorption et dégradation enzymatique	Linzer Kraftfutter GmbH et Co, Linz, Austria

L'effet du temps d'incubation et du pH a été testé sur l'efficacité d'adsorption de ZEA par Mycofix®. Il a été observé que l'adsorption de ZEA augmente avec l'augmentation du temps d'incubation et elle est meilleure au pH neutre qu'acide (figure 36).

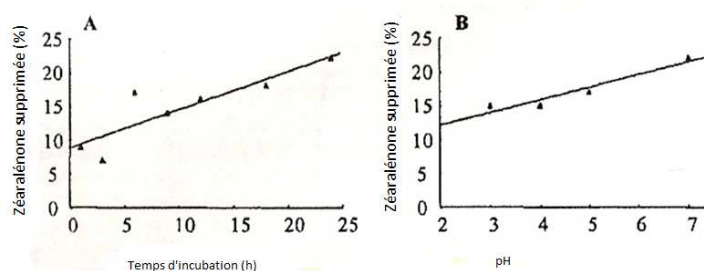


Figure 36 : Effet du temps d'incubation (A) et le pH(B) sur pourcentage de ZEA supprimée dans le solvant par le Mycofix®. (Chaque point correspond à une moyenne de 2 essais) (D'après Döll et al., 2004)

Le charbon actif permet d'absorber (100%) de la ZEA sous toutes les conditions d'expérience (pH mimant l'acidité de l'estomac et de l'intestin). La cholestyramine (94%), aluminosilicate modifié (81%), Toxisorb® (55%) ont montré une grande capacité d'adsorption de ZEA (figure 37). Parmi les adsorbants commerciaux testés, le Toxisorb® est le seul produit ayant la capacité d'adsorber plus de 25% de la ZEA. L'efficacité d'adsorption est moindre dans les conditions du pH de l'estomac.

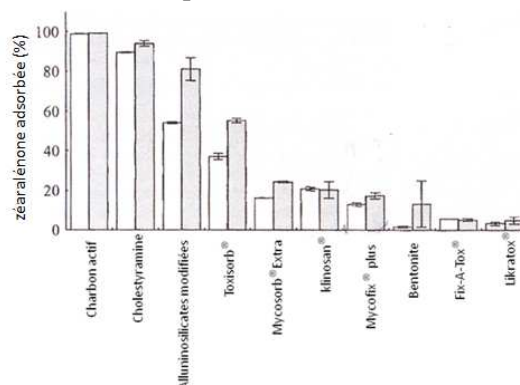


Figure 37 : moyenne du pourcentage de ZEA adsorbée par plusieurs agents détoxifiants sous conditions de pH de l'estomac (blanc) (n=2) et tout le long de l'expérience (gris) (n=4) (d'après Döll et al., 2004).

Le pourcentage de ZEA adsorbée augmente avec l'augmentation du ratio (ZEA/substance détoxifiante) (figure 38).

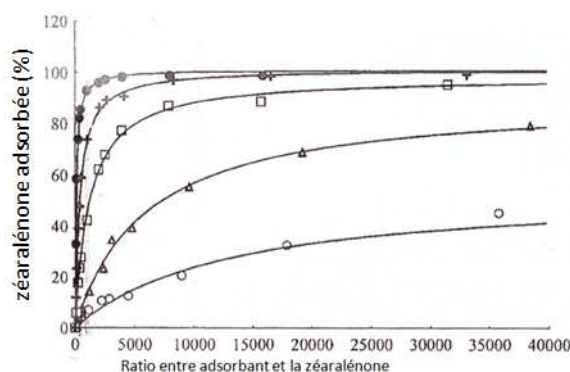


Figure 38 : pourcentage de ZEA adsorbée par cholestyramine (●), aluminosilicate modifié(+), Toxisorb® (□), Mycosorb® Extra (Δ), et bentonite (○) par l'augmentation du ratio (adsorbant/ZEA)(d'après Döll et al., 2004)

Les études *in vivo* réalisées par Döll et al. (2005), révèlent que les aluminosilicates modifiés sont inefficaces contre la ZEA malgré l'efficacité d'adsorption *in vitro*, d'où la nécessité des études *in vivo* pour prouver l'efficacité de ces agents détoxifiants.

L'efficacité *in vivo* des aluminosilicates (4 g/kg d'aliment) comme agent détoxifiant a été testée sur 128 porcelets femelles sevrés ayant reçu dans leur alimentation du maïs contaminé en ZEA (1,2 mg/kg d'aliment). L'ingestion volontaire et le gain de poids vif des animaux ont été considérablement réduits par l'inclusion du maïs contaminé en ZEA dans les régimes alimentaires. Par ailleurs, le poids relatif de l'utérus, de l'estomac et du cœur des animaux ont été sensiblement augmentés. Les concentrations sériques de l'albumine et l'activité de la Glutamate-déshydrogénase (GLDH) ont été considérablement réduits chez les animaux nourris avec le maïs contaminé en ZEA. L'ajout des aluminosilicates dans l'alimentation contaminée n'a pas atténué les effets de la ZEA, et a diminué d'avantage l'ingestion des animaux. La concentration sérique de l'albumine et les activités des ASAT et  $\gamma$ GT ont augmenté de façon significative avec l'ajout des aluminosilicates tandis que la concentration sérique du cholestérol et  $\alpha$ -tocophérol ont diminué de façon significative.

Les concentrations de rétinol et esters de rétinol dans le foie et le sérum n'ont pas été modifiées par les traitements. Les concentrations analysées de la ZEA et de ses métabolites dans la bile a montré que aluminosilicates sont inefficaces dans la prévention de l'absorption de la toxine dans le tractus gastro-intestinal (Döll et al., 2005).

Fruhauf et al. (2011) ont comparé la capacité de liaison l'AFB<sub>1</sub> ou la ZEA sur plusieurs produits levures commerciaux dans des solutions à pH 3 et pH 6,5. Aucune corrélation entre l'adsorption et la composition des produits de levures testées en mannooligosaccharides (MOS) et  $\beta$ -glucanes n'a été observée. Il a été observé des différences de la capacité d'adsorption d'AFB<sub>1</sub> d'une même marque de produits vendus dans différents pays. Cela s'explique par la différence dans la teneur en cendres et la composition minérale des produits. Dans le cas de ZEA, les différences d'adsorption de la même marque ont été moins prononcés (Fruhauf et al., 2011).

Récemment, Sprunsky et al. (2012) ont comparé l'efficacité d'adsorption de la ZEA sur deux adsorbants naturels (talc et diatomite). Il a été montré que la ZEA s'adsorbe plus efficacement sur le talc (54 à 73%) que la diatomite (42 à 53%).

#### 1.4.2 Désactivation des mycotoxines par le produit Biomin® MTV

Un autre additif alimentaire a été mis au point et breveté par Biomin® MTV. Il s'agit de levures nommées *Trichosporon mycotoxinivorans*. Cette levure est capable de dégrader 1mg de ZEA et 5 mg d'OTA (Starkl, 2004b; Griessler, 2008 ; Schatzmayr et al., 2006).

Des essais d'alimentation ont été réalisés en Hongrie (université de Gödöllő) sur des porcelets (39 jours) et en Slovénie (université de Maribor) sur des poulets (42 jours) avec 0,5 ppm d'OTA et 1 ppm d'OTA respectivement en présence de *Trichosporon mycotoxinivorans*. Il a été montré que l'influence négative de l'OTA sur les performances zootechniques (poids et mortalité) pouvait être totalement neutralisée par l'addition de *Trichosporon mycotoxinivorans* (Starkl, 2004b).

L'OTA est détoxifiée par clivage en phénylalanine et OTa (partie isocoumarique de l'OTA). Ce métabolite est décrit comme étant 500 fois moins toxique que l'OTA.

Le métabolite obtenu par biotransformation de la ZEA est la ZEA hydroxylée (ouverture de l'anneau macrocyclique de ZEA au groupe cétone en C6). Les tests de culture cellulaires ont confirmé la perte des effets œstrogéniques provoquées par la ZEA après l'ajout des levures *Trichosporon mycotoxinivorans* (Vikeru *et al.*, 2010). Le métabolite n'a montré aucune activité oestrogénique, (Schatzmayer *et al.*, 2004) même à une concentration 1000 fois supérieure à celle de la ZEA (Vikeru *et al.*, 2010).

#### 1.4.3 Désactivation des mycotoxines par les produits Myco-AD<sup>®</sup> et Myco AD- AZ<sup>®</sup>

Plusieurs études ont été effectuées pour tester l'efficacité des produits Myco-AD<sup>®</sup> et Myco-AD AZ<sup>®</sup> (de Special Nutrient Inc, USA) sur les organes cibles dans plusieurs universités et centres de recherche partout dans le monde (Tamames, 2009).

Myco-AD<sup>®</sup> est un aluminosilicate (HSCAS), et Myco-AD AZ<sup>®</sup> est un mélange de physlosilicate purifié et d'aluminosilicate (HSCAS). C'est une argile dipolaire, qui a un mélange de charges négatives et positives. Cela rend plus efficace la liaison et ont un large spectre d'adsorption des mycotoxines, car de nombreuses toxines ont deux charges positives et négatives ou ont une seule charge.

Dans une étude de 28 jours, l'OTA (2 ppm) a provoqué des lésions rénales et hépatiques chez les poulets (tableau 16). L'incorporation dans l'alimentation de l'adsorbant MYCO-AD<sup>®</sup> a permis de réduire efficacement les lésions provoquées par l'ochratoxine A (Tamames, 2009).

Tableau 16 : Effet sur la taille du foie et des reins, sur les lésions rénales et hépatiques chez les poulets âgé de 28 jours, nourris avec 2 ppm d'OTA (adapté de Tamames, 2009).

Traitement	Poids du foie/100g de poids corporel	Lésions sur le foie	Poids du rein/100g de poids corporel	Lésions sur le rein
Témoin	4,9	négative	1,09a	négatif
2,5kg MYCO-AD <sup>®</sup>	4,96	négative	1,19a	négatif
Ochratoxine A (2ppm)	4,89	19% négative 63% modérée 18% sévère	1,37b	6% négative 19% modérée 88% sévère
2,5kg MYCO-AD <sup>®</sup> + ochratoxine A (2ppm)	4,81	44% négative 19% légère 31% modéré 6% sévère	1,33b	62% négative 19% légère 6% modéré 13% sévère

a , b, valeurs au sein d'une colonne avec différence  
Lettres sont significativement différent (P<0,005)

Des truies ont ingéré 6ppm de DON et 1,2 ppm de ZEA pendant 21jours. L'effet des de ces toxines en présence et en absence de l'adsorbant MYCO-AD AZ est résumé dans la figure 39 et le tableau 17. Il a été noté en présence de ZEA et DON dans l'alimentation des truies, une augmentation de la taille de la vulve des truies (figure 39), un effet sur le poids du foie et le gain de poids corporel (tableau 17). L'ajout MYCO-AD AZ dans leur alimentation a protégé les truies de l'effet de ces deux toxines (ZEA plus DON).

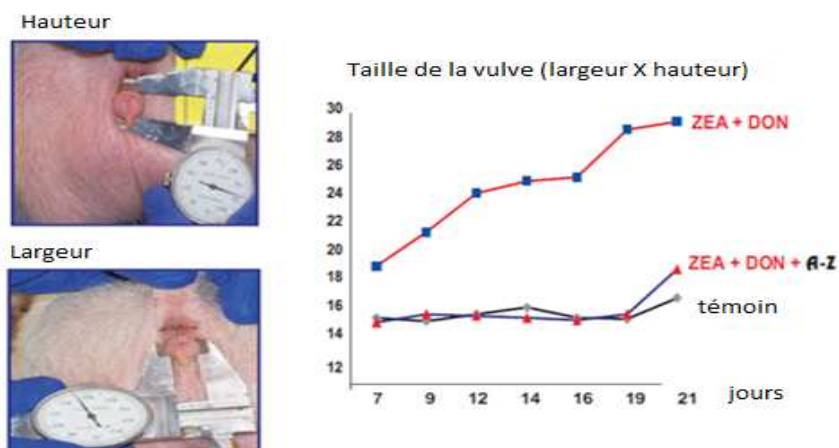


Figure 39 : Effet sur la taille de la vulve et les organes de reproduction des truies nourries avec 6 ppm de DON et 1,2 ppm de ZEA pendant 21 jours (d'après Tamames, 2009).

Tableau 17 : Effet sur le poids du foie et le poids corporel des truies nourries avec 6 ppm de DON et 1,2 ppm de ZEA pendant 21 jours (d'après Tamames, 2009).

Traitement	Poids du foie/100g de poids corporel	Annoréxie gain de poids corporel (kg)
Témoin	3,76a	2,95a
1,2ppm ZEA +6ppm DON	2,91b	1,46b
1,2 ppm ZEA+6 ppm DON + 1kg MYCO-AD AZ	3,12c	2,23c

a, b, c, valeurs au sein d'une colonne avec différence  
Lettres sont significativement différent ( $P < 0,005$ )

Dans une étude réalisée *in vitro*, l'adsorbant MYCO-AD AZ (0,1% p/v) adsorbe après 1heure de contact, 90% d'OTA (2µg/ml) et plus de 99% d'aflatoxines (1 ou 10µl/ml) à pH7 (Avantaggiato *et al.*, 2007), mais l'effet n'a pas été testé *in vivo*.

## 2. La désactivation par les antioxydants

Le stress oxydatif (OS) est le résultat de production d'espèces oxydantes réactives (ROS) qui est supérieure à la capacité des défenses cellulaires anti-oxydantes dont le rôle est de supprimer ces espèces toxiques. La première étape dans les mycotoxicoses est généralement due à un déséquilibre du potentiel oxydoréducteur

La peroxydation lipidique est la conséquence principale lors de contamination par les mycotoxines (AF, T2, FB, OTA, ZEA, DON) (Mezes *et al.*, 1999 ; Galvano *et al.*, 2001). Un équilibre subtil entre antioxydant et pro-oxydant dans l'organisme et plus spécifiquement dans les cellules, régule les voies métaboliques permettant le maintien de l'immunité, la croissance et le développement. Cet équilibre peut être régulé par des nutriments tels que la vitamine E ; les caroténoïdes (vit A) ; et le sélénium (Surai *et al.*, 1999 ; 2001 ; Surai, 2000 ; Rizzo *et al.*, 1994, Galvano *et al.*, 2001). Dans la plupart des cas la peroxydation lipidique provoquée par les mycotoxines est associée à une baisse du taux des défenses antioxydantes naturelles de l'organisme.

### 2.1 Mycotoxines et stress oxydatif -Impact sur les défenses anti-oxydantes

#### 2.1.1 OTA

L'OTA stimule la peroxydation des lipides. Cet effet est évalué par la mesure des TBARS (*thiobarbituric acid reactive substance*). L'exhalation d'éthane, la formation du radical hydroxyle et les coupures simple brin dans l'ADN sont aussi indicateurs de l'effet pro-oxydant de l'OTA. Les différentes études sont répertoriées dans le tableau 18.

Tableau 18 : Impact de l'OTA sur la peroxydation lipidique

	tissu	Mesure de la peroxydation lipidique	Effet protecteur de l'antioxydant	références
OTA <i>in vitro</i>	Microsomes de foie de rat	TBARS↑		Rahimtula <i>et al.</i> , 1988 ; Gautier <i>et al.</i> , 2001
OTA dans l'alimentation animale	Rats	exhalation d'éthane↑,		Rahimtula <i>et al.</i> , 1988
OTA <i>in vitro</i>		TBARS↑, absorption d'oxygène ↑		Omar <i>et al.</i> , 1990
OTA/analogues	<i>Bacillus brevis</i>	Génération de radicaux libres (EPR) ↑	Vit E	Hoehler <i>et al.</i> , 1996
OTA dans l'alimentation animale	Foie de poulet	TBARS ↑		Hoehler & Marquardt, 1996 ; Hoehl <i>et al.</i> , 1997
OTA	Cellules de véro	TBARS↑	SOD, aspartame catalase	Baudrimont <i>et al.</i> , 1997a ; 1997b
OTA dans l'alimentation animale	Foie de rat	TBARS↑		Hoehler <i>et al.</i> , 1997
OTA	Système d'oxydation	Radical hydroxy ↑, coupure simple-brin ADN↑		Gilman <i>et al.</i> , 1999
OTA	Culture primaire d'astrocytes et neurones	TBARS ↑, relargage LDH↑	Retinol, acide ascorbique	Belmadani <i>et al.</i> , 1999
OTA dans l'alimentation animale	Rein de souris et de rat	Formation d'adduit à l'ADN ↑	Vit E	Gross <i>et al.</i> , 1997
OTA <i>in vitro</i>	Microsomes de rein de rat	TBARS↑		Gautier <i>et al.</i> , 2001

La présence d'OTA dans l'aliment diminue significativement le taux d' $\alpha$  tocophérol dans le foie de poulets (Hoehler & Marquardt, 1996) et l'assimilation des caroténoïdes chez le poulet (Schaeffer *et al.*, 1987; Huff & Hamilton 1975).

Les dommages oxydatifs sont des manifestations toxiques provoquées par l'OTA. Il a été observé que, dans des microsomes de foie de rat, la peroxydation lipidique est corrélée à la conversion de l'OTA en 4(S)-OH-OTA (Omar & Rahimtula, 1993).

Dans le but de voir si la voie oxydative de métabolisation de l'OTA était en relation avec sa génotoxicité, il a été testé la formation d'adduits à l'ADN dans les reins et les testicules de souris en faisant varier cette voie de métabolisation. L'administration simultanée de superoxyde dismutase et de catalase avant le gavage des souris par l'OTA a provoqué une diminution des adduits totaux dans l'ADN des reins et des testicules de 90 % et 30 % respectivement. Ces adduits sont donc probablement produits par voie oxydative (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993b ; 1994a). En utilisant des cellules de vésicules séminales de bélier particulièrement riche en prostaglandine synthétase (PGHS) (enzyme permettant la cooxydation de xénobiotiques (Marnett & Eling, 1983; Eling *et al.*, 1990) lors de la synthèse de prostaglandines), il a été montré que l'OTA provoque la formation de micronoyaux (Degen *et al.*, 1994).

Des souris ont aussi été prétraitées avec de l'aspirine ou de l'indométhacine avant l'administration d'OTA. Ces deux substances inhibent partiellement la PGHS. Les résultats montraient une modification du profil des adduits avec disparition totale de certains adduits aussi bien dans le rein que dans le foie et atténuation des autres (Obrecht-Pflumio *et al.*, 1996). En culture de cellules pulmonaires humaines, l'utilisation d'indométhacine ou de l'acide nordihydroguarétique (NDGA) a permis de montrer que l'OTA était métabolisée en métabolites génotoxiques par la lipoxigénase, alors que la PGHS a plutôt un effet protecteur (Pinelli *et al.*, 1999a). Pour prouver que la métabolisation de l'OTA peut s'effectuer par un mécanisme oxydatif, les animaux ont été prétraités par 3 vitamines connues pour avoir un pouvoir antioxydants : la vitamine A, la vitamine E et la vitamine C. Cette dernière est la plus efficace des trois pour diminuer la génotoxicité de l'OTA. Ce résultat confirme celui obtenu par Bose & Sinha (1994) montrant que la vitamine C est capable de diminuer les anomalies lors de la mitose et de la méiose induite par l'OTA. Mais dans tous les cas, une grande partie des adduits disparaît (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1994b ; Grosse *et al.*, 1997). Hoehler *et al.* (1996) ont aussi étudié l'effet des vitamines E et C sur la toxicité de l'OTA et T-2 toxine et ont obtenu des résultats similaires.



### 2.1.2 AFB<sub>1</sub>

La mutagénicité et la carcinogénicité de l'AFB<sub>1</sub> est le résultat de l'époxydation en position 8,9 (Essigman *et al.*, 1982 ; Gurtoo & Dave, 1975 ; Campbell & Hayes, 1976).

Des études mettent en évidence la formation de cet époxyde par un mécanisme dépendant de la cascade de l'acide arachidonique (AA). L'AFB<sub>1</sub> est cooxydée par la PGHS, (Battista & Marnett, 1985; Liu *et al.*, 1990, 1993) et la lipoxigénase (Liu & Massey, 1992; Roy & Kulkarni, 1997). Le blocage du relargage de l'AA des membranes par la phospholipase A2 diminue la formation des adduits AFB<sub>1</sub>-DNA de 30 à 50 %. Une étude avec des microsomes de vésicule séminale de bélier, riche en PGHS, montre que l'adduit formé est le même que celui obtenu par métabolisation en présence de CYP (Battista & Marnett, 1985). L'équipe de Liu a montré, par utilisation de PGHS et de lipoxigénase provenant de tissus de cobaye, que les adduits formés par cooxydation l'étaient dans le foie, le poumon et le rein (Liu *et al.*, 1990; Liu & Massey, 1992). Ainsi la formation d'adduits est inhibée par l'indométhacine, inhibiteur de la PGHS et par le NDGA, inhibiteur de la lipoxigénase. L'analyse des cinétiques de formation de cet adduit indique que l'époxydation par la lipoxigénase s'effectue à des doses plus basses qu'avec la PGHS (Liu & Massey, 1992). Ces voies de métabolisation sont particulièrement importantes dans les tissus extra-hépatiques (rein, poumon, tissus embryonnaires) pour lesquels, le taux de CYP est bas, alors que les PGHS et autres peroxydases sont largement représentées (Christ & van Dorp, 1972 ; Yoshimoto *et al.*, 1986 ; Mitchell *et al.*, 1985). Cette cooxydation a été mise en évidence avec des cellules pulmonaires humaines (Hunter *et al.*, 1985; Donnelly *et al.*, 1994), suggérant l'importance de ce mécanisme dans l'activation de l'AFB<sub>1</sub> au niveau des poumons dans le contexte d'une contamination par voie pulmonaire (Sorenson *et al.*, 1981; Hayes *et al.*, 1984).

L'AFB<sub>1</sub> interfère avec l'accumulation des caroténoïdes dans les tissus des poulets (Schaeffer *et al.*, 1988). Ceci est dû au fait d'une interférence avec l'absorption et le transport des caroténoïdes au niveau du jéjunum (Tyczkowski & Hamilton, 1987a, b).

La peroxydation lipidique induite par l'AF a été étudiée au niveau du foie et du rein de rats ainsi que dans des systèmes cellulaires (tableau 19).

Tableau 19 : Impact de l'AFB<sub>1</sub> sur la peroxydation lipidique

mycotoxines	tissu	Mesure de la peroxydation lipidique	Effet protecteur de l'antioxydant	références
AFB <sub>1</sub> dans l'alimentation	foie	TBARS ↑, diènes conjugué ↑	SE, vit E	Shen <i>et al.</i> , 1994
AFB <sub>1</sub>	Culture d'hépatocytes	TBARS ↑, relargage LDH ↑	SOD, catalase	Shen <i>et al.</i> , 1995
AFB <sub>1</sub>	foie	TBARS ↑	Extrait de <i>Semecarpus anacardum</i>	Premalatha <i>et al.</i> , 1997
AFB <sub>1</sub>	Culture d'hépatocytes	TBARS ↑, formation ROS↑	Extrait de <i>Silva miltorrhiza</i>	Liu <i>et al.</i> , 1999
AFB <sub>1</sub>	foie	TBARS ↑	Vit E, tematin	Souza <i>et al.</i> , 1999
AFB <sub>1</sub> dans l'alimentation	foie	GSH-Px ↓	Se, vit E	Choi <i>et al.</i> , 1995
AFB <sub>1</sub>	Foie et rein	TBARS↑	picroliv	Rastogi <i>et al.</i> , 2001a
AFB <sub>1</sub>	foie	GSH, SOD, catalase, GSH-Px↓		Rastogi <i>et al.</i> , 2001b
AFB <sub>1</sub>	Hépatocytes primaires	TBARS ↑, GSH ↓, génération ROS↑		Yang <i>et al.</i> , 2000
AFB <sub>1</sub>	foie	TBARS↑		Ha & Kim, 1998
AFB <sub>1</sub>	foie	TBARS ↑, GSH-Px ↓, GSH-R↓	Mélatonine	Meki <i>et al.</i> , 2001
AFB <sub>1</sub> in vitro		TBARS↑	Vit E	Dvorska & Surai, 2001

### 2.1.3 ZEA

Plusieurs adduits ont été détectés dans les organes de souris après un traitement avec la ZEA. Le prétraitement des souris femelles avec des  $\alpha$  tocophérol (vit E), avant l'administration de la ZEA inhibe de manière significative la formation d'adduits de l'ADN dans le foie et le rein. Le nombre total d'adduits l'ADN après le traitement avec la vit E a été diminué de 45% et 58% dans le foie et le rein, respectivement (Grosse *et al.*, 1997).

La ZEA (40 mg / kg pc) induit des altérations significatives dans tous les marqueurs de stress oxydatif testé dans les reins et les foies des souris Balb/c. Le traitement combiné de ZEA (40 mg /kg pc) avec la plus faible dose testée d'extraits de cactus (*Opuntia ficus-indica*) (25 mg/kg pc) a montré une réduction totale des dommages oxydatifs induits par la ZEA pour tous les marqueurs testés. Il a été conclu que l'extrait de cactus a été efficace dans la protection contre la ZEA (Zourqui *et al.*, 2008). La ZEA est métabolisé en  $\alpha$  zéaralénol et  $\beta$  zéaralénol. Ces métabolites inhibent la viabilité cellulaire, la synthèse des protéines et de l'ADN et induisent des dommages et la sur-expression de protéines de stress (Ouanes-Ben Othmen *et al.*, 2008). L'addition simultanée de vitamine E (6mM) avec la ZEA (1,5 mM), n'empêche pas la lyse bactérienne de *E.coli* induite par la ZEA. Par contre, lorsque la vitamine E (6-12 mM) est pré-incubée 1heure avant l'addition de ZEA dans le milieu, la croissance bactérienne de *E.coli* est restaurée et il n'y a pas de lyse bactérienne. La vitamine E agit comme antioxydant vis-à-vis des espèces réactives de l'oxygène au niveau de la membrane ou à l'intérieur de la bactérie. Il pourrait ainsi prévenir la peroxydation des lipides et préserver l'intégrité des membranes et de l'ADN. La vitamine E agirait comme un capteur de radicaux dans la prévention de la formation de radicaux libres éventuellement produite par ZEA et/ou de ses métabolites (Ghédira-Chékir *et al.*, 1998). Ceci est en accord avec les précédentes données (Li *et al.*, 1991) sur la prévention des effets génotoxiques de ZEA par la vitamine E (Grosse *et al.*, 1997).

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des espèces oxygénées activées (ROS) est donc particulièrement fragile (figure 40). La production des (ROS) est strictement régulée par notre organisme qui a développé des défenses antioxydantes pouvant nous protéger contre les effets potentiellement destructeurs des (ROS).

Ces systèmes se composent - d'enzymes (superoxydes dismutases Cu-Zn et Mn, catalase, glutathion peroxydases, couple thiorédoxine - thiorédoxine réductase, hème oxygénase, heat shock protéines),  
- de protéines transporteuses du fer et du cuivre (transferrine, ferritine, céruléoplasmine),  
- de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, glucose, vitamines A, C, E, ubiquinone, caroténoïdes, flavonoïdes),  
- d'oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium) indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes.

Un système de défense secondaire composé d'enzymes dont le rôle consiste à empêcher l'accumulation dans la cellule de protéines ou d'ADN oxydés et à dégrader leurs fragments toxiques, complète la panoplie des moyens de protection contre les (ROS).

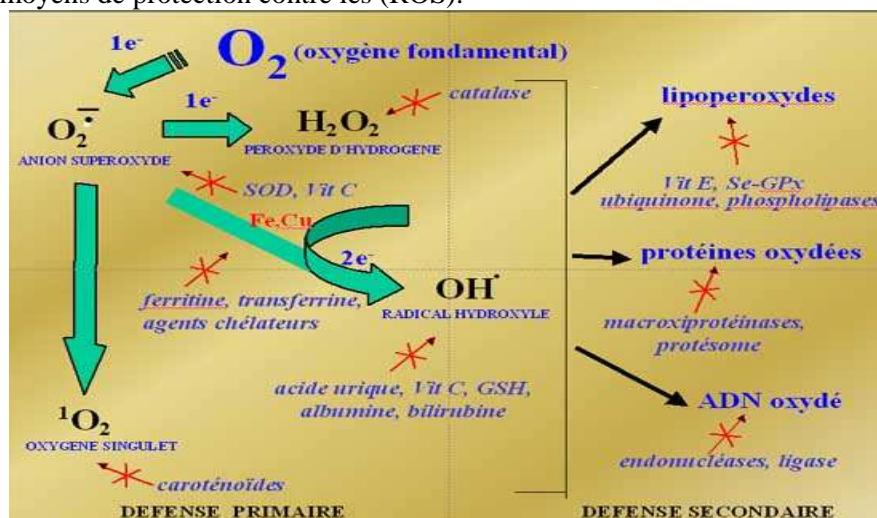


Figure 40 : Balance entre antioxydants et pro-oxydants

## 2.2 Le glutathion (GSH)

Le glutathion (figure 41) est un tri peptide obtenu par condensation de l'acide glutamique, la cystéine et la glycine (L-Glutamyl-L cystéinyglycine). La fonction thiol (SH) lui confère ses principales propriétés biochimiques.

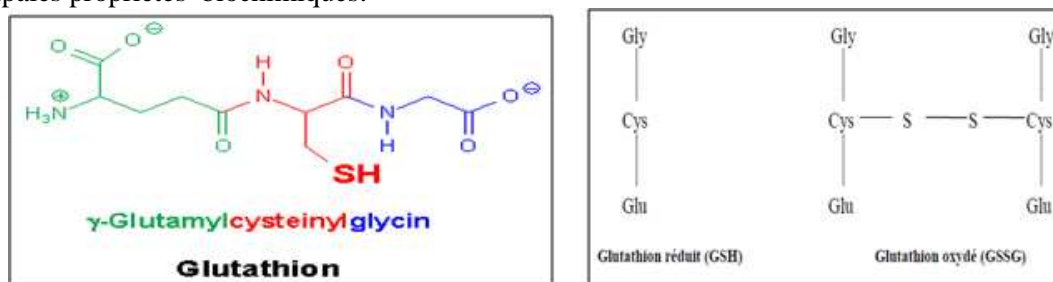
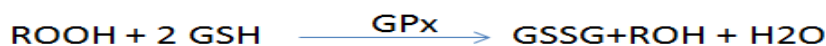


Figure 41 : Formule chimique du glutathion (à gauche), forme réduite et oxydée (à droite) (adapté de Chabaud, 2007)

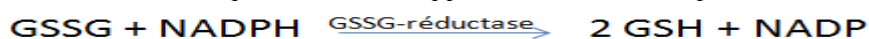
Le glutathion est considéré comme le plus puissant des antioxydants. Il protège l'intégrité cellulaire en neutralisant les radicaux libres et renforce le système immunitaire. Le glutathion est un puissant complexe antioxydant car il ne se limite pas à un simple apport exogène en glutathion mais fournit à l'organisme, sous leur forme naturelle, tous les éléments nécessaires à la production endogène et intracellulaire du glutathion.

La L-cystéine occupe la place centrale dans la molécule tri-peptidique de glutathion dont elle est le précurseur le plus efficace et le plus immédiat. La N-acétylcystéine est utilisée par le foie pour fabriquer le GSH-peroxydase.

Le glutathion est synthétisé par l'enzyme glutathion synthétase et réduit par l'enzyme GSH-réductase. Il joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. Le glutathion participe à l'activité des glutathion peroxydases en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur :



La régénération de la fonction thiol GSH à partir de la forme oxydée GSSG se fait grâce à la glutathion réductase qui nécessite un apport de NADPH, H<sup>+</sup> par la voie des pentoses phosphates.



Le glutathion est également impliqué dans le maintien de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$ -tocophérol sous formes réduites. La diminution du glutathion hépatique peut indirectement entraîner des effets toxiques dans les hépatocytes en augmentant le stress oxydatif. Cette diminution est commune dans les affections hépatiques sévères, augmentant le risque de dommage oxydant (Watson, 2002).

### 2.2.1 Les mycotoxines et le GSH

En général, les mycotoxines entraînent une baisse du taux de glutathion réduit (GSH) dans les hépatocytes. Ceci a notamment été mis en évidence récemment avec la ZEA (Hassen *et al.*, 2007). Comme le glutathion est le pivot du maintien du statut oxydo-réducteur de la cellule, un changement dans le taux de GSH peut être dramatique.

La FB<sub>1</sub> diminue le taux de GSH dans les reins de porcs, simultanément à une augmentation de l'activité de la glutathion réductase (Kand & Alexander, 1996). La toxine T2 diminue l'activité de la GST hépatique (Ahmed & Ram, 1986).

Lors d'aflatoxicose, il y a une déplétion du glutathion dans les hépatocytes (Liu *et al.*, 1999). Une baisse de l'activité de la glutathion peroxydase est observée dans le sang lors d'ingestion d'AF (Choi *et al.*, 1995). Si l'administration a lieu par voie ip, il y a diminution des activités SOD (superoxyde dismutase), catalase, glutathion peroxydase et glutathion réductase au niveau du foie (Rastogi *et al.*, 2001). Une baisse significative du taux de SOD est observée chez des canards contaminés en AF (Barraud *et al.*, 2001). De même l'OTA diminue le taux de GSH dans le foie (Atroshi *et al.*, 2000), ainsi que dans le rein et les testicules (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993).

### 2.2.1.1 OTA

Généralement, la voie de métabolisation par conjugaison au glutathion est considérée comme une voie de détoxification (Jakoby & Habig, 1980). Néanmoins, certains dérivés provenant de la conjugaison au glutathion génèrent des composés électrophiles pouvant être mutagènes et cancérogènes (Van Bladeren *et al.*, 1980 ; Vadi *et al.*, 1985 ; Dekant & Vamvakas, 1989; Lafleur & Retèl, 1993). De plus, il est évident que l'accumulation de conjugués du glutathion peut être néphrotoxique dans certains cas (Pour une revue, voir Monks & Lau, 1987). Deux classes de conjugués peuvent être distinguées : ceux agissant directement, sans activation métabolique (leur action est donc indépendante des microsomes) et ceux devenant toxiques ou génotoxiques après métabolisation. Au niveau du rein, les dérivés conjugués au glutathion vont être métabolisés par action de la  $\gamma$ -glutamyltransférase et la glycine en dérivé cystéine correspondant. Ces dérivés S-cystéines sont transportés dans les cellules rénales où ils auront 3 possibilités :

- (i) ils sont excrétés sous forme inchangée dans le plasma.
- (ii) ils sont N-acétylés en dérivés mercapturiques correspondants (Jakoby & Habig, 1980).
- (iii) ils sont soumis à l'action de la  $\beta$ -lyase et forment des dérivés thiols très réactifs responsables notamment des effets néphrotoxiques (Dekant *et al.*, 1988).

Le fait de diminuer le taux de glutathion au niveau rénal diminue donc la formation de conjugués toxiques. D'autre part, au niveau rénal, ces dérivés thiols bloquent l'action de la glutathion peroxydase. Si cet enzyme est bloqué, il y aura augmentation de  $H_2O_2$  qui va générer des formes  $OH^\bullet$  à l'origine de la lipoperoxydation, pouvant conduire à la formation de produits radicalaires très réactifs. Cette voie de métabolisation a été testée (Pfohl-Leschkowicz *et al.*, 1993b, 1994) par l'administration de dépléteur de glutathion ou de substances pouvant augmenter le taux de glutathion. L'administration de phorone à des souris provoque la diminution du taux de glutathion de 66% et de 11% respectivement dans les reins et les testicules après 4 h. Cette substance administrée avant l'OTA fait baisser le taux d'adduits dans les reins et dans les testicules. La N-acétylcystéine (NAC) qui diminue également le taux de glutathion dans ces 2 organes induit aussi une diminution des adduits dans ces tissus. Par contre dans le foie où cette substance augmente le taux de glutathion, on observe une augmentation dramatique du taux d'adduits. Ces résultats indiquent que le glutathion joue un rôle primordial dans la génotoxicité de l'OTA, soit par la formation de dérivés conjugués génotoxiques, soit par ses propriétés oxydoréductrices. (Pfohl-Leschkowicz *et al.*, 1993b, 1994). Deux autres substances, qui diminuent la fixation de glutathion aux xénobiotiques, ont été testées ; notamment le diéthylmaléate (DEM) et la buthionine sulfoximine (BSO) qui agissent par deux mécanismes différents: le premier par compétition au niveau de la glutathion transférase, le deuxième par inhibition de la  $\gamma$ -glutamine synthétase. Les résultats obtenus permettent de conclure à l'implication de la conjugaison au glutathion dans la génotoxicité de l'OTA. L'effet bénéfique est observé essentiellement au niveau rénal. En effet dans le foie, le DEM augmente le nombre d'adduits (Pfohl-Leschkowicz *et al.*, 1994 ; Grosse *et al.*, 1994). L'implication plus particulière de la leucotriène  $C_4$  synthétase qui est une glutathion-S-transférase microsomique (Scoggan *et al.*, 1997) a clairement été démontrée sur cultures cellulaires bronchiques humaines. L'adjonction d'acide éthacrynique après traitement des cellules par l'indométhacine, inhibe la formation d'adduits à l'ADN, par blocage de la leucotriène  $C_4$  synthétase.

Le rôle spécifique de la glutathion conjugaison chez ces animaux a été testé dans l'expérience où les rats ont été traités par le 2-mercaptoéthane sulfonate sodique (MESNA). Cette expérience permet de montrer que le MESNA réduit considérablement le taux de caryomégalias et de conclure que l'OTA induit la formation de 2 types différents d'adduits : les uns étant la conséquence d'un stress oxydatif, les autres sont des adduits correspondant à la fixation d'un métabolite de l'OTA (Pfohl-Leschkowicz, *et al.*, 2002a). Plus récemment, en culture cellulaire il a été démontré que la génotoxicité de l'OTA était due à la métabolisation successive par le cytochrome 2C et la LOX, et plus spécifiquement la LTC<sub>4</sub> synthétase qui est une glutathion-S-transférase microsomiale (El Adlouni *et al.*, 2000 ; Manderville & Pfohl-Leschkowicz, 2008).

Le dérivé benzoquinone (OTQ), formé par déchloration oxydative de la partie parachlorophénol de l'OTA est corrélé à l'activité génotoxique de l'OTA. Par analogie à la métabolisation du pentachlorophénol, l'OTQ peut conduire à l'adduit à l'ADN, appelé benzetheno dG-OTA (figure 4 partie bibliographique 1) (Pfohl-Leschkowicz & Manderville, 2007 ; Pfohl-Leschkowicz & Manderville, 2012).

### 2.2.1.2 AFB<sub>1</sub>

L'époxyde d'AFB<sub>1</sub> peut être désactivé par conjugaison au glutathion. Ce mode de détoxification est la voie majeure d'excrétion chez un grand nombre d'espèces animales (Lotlikar *et al.*, 1984 ; Neal & Green, 1983 ; Monroe & Eaton, 1988). Cette réaction est catalysée par les glutathion-S-transférases (GST) dont il existe 5 classes différentes (alpha, mu, pi, theta et une microsomique) (Gopalan *et al.*, 1992). Coles *et al.* (1985) ont montré que c'est la GST alpha qui est la forme la plus active pour conjuguer l'époxyde AFB<sub>1</sub> dans le foie de rat. C'est la forme *exo* qui est conjuguée par la GST alpha, alors que la forme *endo* est conjuguée par la GST mu (Raney *et al.*, 1992b). Contrairement au rat, la souris est relativement résistante aux effets toxiques et cancérogènes de l'AFB<sub>1</sub>. Ceci est vraisemblablement dû au fait que le cytosol de la souris possède une grande quantité de GST mu qui conjugue la forme *exo* (Degen & Neuman, 1981; Raney *et al.*, 1992b). En effet, la capacité du cytosol de rat à conjuguer l'époxyde d'AFB<sub>1</sub> est 50 fois moins importante que celle du cytosol de souris (Monroe & Eaton, 1987).

### 2.2.1.3 ZEA

L'administration de ZEA seule chez les souris male Bablb/c ou à des rats Wistar a entraîné des baisses significatives dans les taux de la phosphatase alcaline, lactate déshydrogénase, alanine et aspartate aminotransférase dans le foie (Ben Salah-Abbès *et al.*, 2009 ; Satadnik *et al.*, 2010). Par ailleurs, une augmentation marquée de la peroxydation lipidique et une diminution de la glutathion peroxydase, glutathion réductase, superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion-S-transférase, les concentrations d'ARN et d'ADN ont également été observées dans le tissu hépatique des souris ou des rats traitées avec la ZEA (Ben Salah-Abbès *et al.*, 2009 ; Satadnik *et al.*, 2010). Le co-traitement de la ZEA avec des extraits de radis (*Raphanus. Sativus*) a permis de retrouver les taux normaux de tous les paramètres étudiés (Ben Salah-Abbès *et al.*, 2009).

## 2.3 Le sélénium (Se)

Le sélénium (Se) a été découvert par les chimistes Jöns Jacob Berzélius (1779-1848) et Johan Gottlieb Gahn en 1817 dans la matière subsistant lors de la préparation d'acide sulfurique. Le sélénium peut réagir avec de nombreux éléments et donne des composés de propriétés voisines des composés correspondants du soufre.

Il présente quatre états d'oxydation (Lebreton *et al.*, 1998) : valence -2 : séléniure (Se<sup>2-</sup>), valence 0 : sélénium élémentaire (Se), valence +4 : sélénite (SeO<sub>3</sub>), valence +6 : sélénate (SeO<sub>4</sub>).

Dans l'organisme, le sélénium est présent sous forme de séléniol (R-Se-H) ou de sélénoéther (R-Se-R). Il peut également être substitué au soufre dans les acides aminés soufrés, telles que la méthionine et la cystéine, pour former les composés analogues sélénés : séléniométhionine et sélénocystéine (figure 42) (Delattre *et al.*, 2005 ; Ducros *et al.*, 2004).

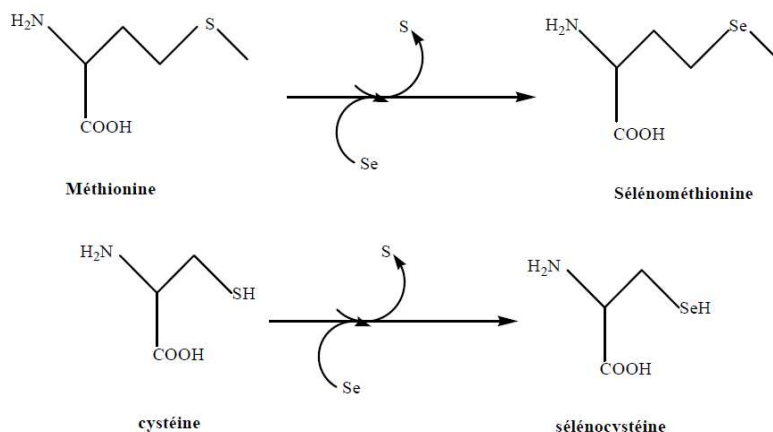


Figure 42 : Formation de composés sélénés dans l'organisme (Siliart, 2007)

Dans les années 1950, on a découvert que Se jouait un rôle physiologique et que les concentrations élevées entraînaient l'apparition de nécrose du foie chez les rats (Schwartz & Foltz, 1957), de la diathèse exsudative chez les poussins (Patterson *et al.*, 1957), et la dégénérescence musculaire chez les veaux et les agneaux (Schubert *et al.*, 1961).

Au début des années 1970, le rôle biologique du Se est apparu avec la découverte des sélénoprotéines de la glutathion peroxydase (GSHPx; Rotruck *et al.*, 1973). Au cours des 30 dernières années, 24 nouvelles Se-protéines ont été identifiées, incluant les thioréductases, diiodinases et sélénoprotéines P et W (Underwood & Suttle, 2001).

Dans les aliments, le sélénium est généralement présent sous forme organique, principalement la sélénométhionine (SeMet). La forme diététique inorganique principale du sélénium est le sélénite de sodium ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ).

Les composés de sélénium sont absorbés dans l'intestin grêle. L'absorption est meilleure pour les formes organiques (sélénate, SeMet) et s'effectue par un mécanisme de transport actif destinés aux homologues soufrés. Le sélénite, quant à lui, est absorbé par simple diffusion passive mais son absorption est stimulée par la présence de nutriments à groupements thiols, comme la cystéine (thèse Chabaud, 2007). Le sélénium est rapidement capté par le foie. Le foie et les érythrocytes sont les principaux lieux de conversion des formes inorganiques du sélénium (sélénate, sélénite) en formes organiques (sélénide) ; ces deux formes (sélénate, sélénite) sont utilisées pour l'incorporation dans des sélénoprotéines. Dans le foie, la SeMet est métabolisée, par la voie de trans-séléation (similaire à la trans-sulfuration qui transforme la méthionine en cystéine), en sélénocystéine qui est ensuite réduite en sélénide et incorporée dans les sélénoprotéines (Center, 2004 ; Suzuki 2005).

Plus de 80% du sélénium présent dans le sang est incorporé ou lié à des protéines : la sélénoprotéine P, la glutathion peroxydase plasmatique, et à d'autres sélénoprotéines non spécifiques. Le sélénium est majoritairement excrété, sous forme de dérivés méthyles, dans l'urine.

Sur la figure 43 est schématisée la voie de biosynthèse de la sélénométhionine et son métabolisme (revue de Schrauzer, 2000).

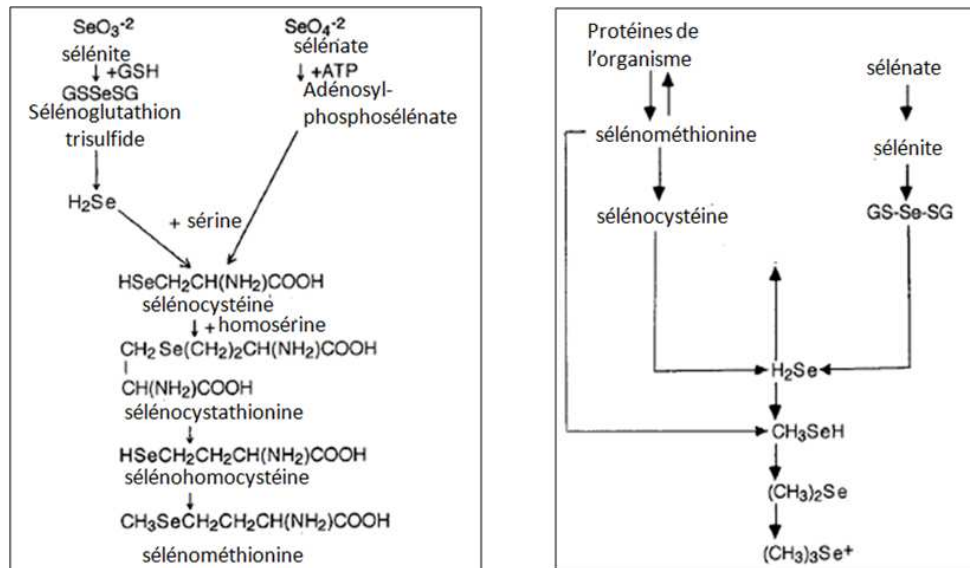


Figure 43 : Biosynthèse du sélénométhionine dans les plantes, algues et les levures (à gauche) ; métabolisme du sélénométhionine, sélénite et sélénate (à droite) (d'après Schrauzer, 2000).

### 2.3.1 Le sélénium et la production des espèces oxygénées activées (ROS)

A chaque fois qu'une pathologie est susceptible d'entraîner une production accrue de radicaux libres provoquant des lésions cellulaires et une augmentation de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines, le sélénium est susceptible de jouer un rôle protecteur (voir figure 44). Cet effet serait dû aux glutathion-peroxydases dont certains types sont dépendants du sélénium (Rotruck *et al.*, 1973). Pour une revue générale, voir dans (Piva & Galvano, 1999 ; Galvano *et al.*, 2001).



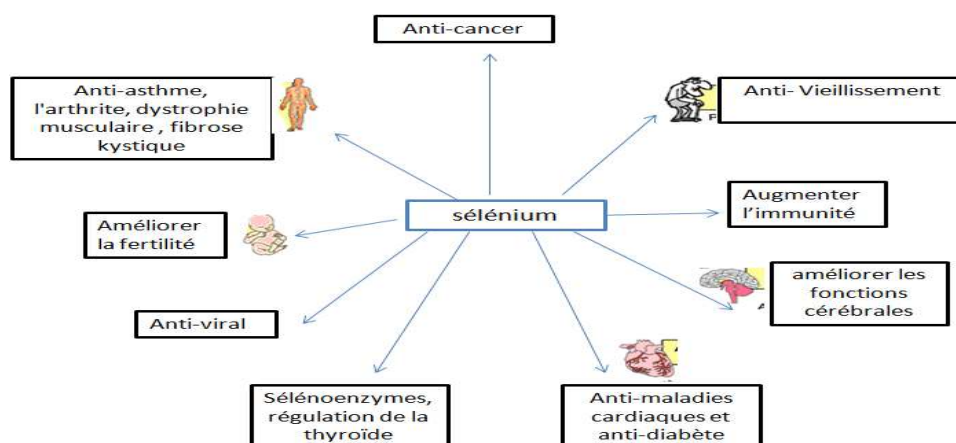


Figure 44 : Effets bénéfiques du sélénium

La glutathion peroxydase (GPx) a besoin du glutathion et du sélénium pour fonctionner correctement. Son rôle principal est d'éliminer les peroxydes lipidiques résultant de l'effet du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés.

Tout comme la SOD (superoxyde dismutase), la glutathion peroxydase sélénio-dépendante se comportera de deux façons différentes face au stress oxydant : surexpression de l'enzyme dans un premier temps, puis destruction si le stress oxydant perdure de manière permanente. Une diminution de l'activité de la GPx peut également provenir d'un apport alimentaire trop faible en sélénium. Le Se n'est pas en tant que tel un antioxydant mais il participe au processus de défense contre les ROS comme co-facteur de la glutathion peroxydase.

Le Se est un oligoélément indispensable qui protège les membranes cellulaires du stress oxydatif, et donc peut intervenir dans la protection des mycotoxines agissant sur le stress oxydatif. L'effet du sélénium comme agent de la protection contre les effets toxiques de mycotoxines a été rapportée par plusieurs chercheurs

Quelques études décrites ci-dessous décrivent l'intérêt du sélénium pour contrecarrer les effets toxiques principalement de deux mycotoxines (AFB<sub>1</sub> et DON).

### 2.3.2 Le sélénium et l'AFB<sub>1</sub>

Il a été démontré que le sélénium inhibe la liaison de l'AFB<sub>1</sub> avec l'ADN. Les mêmes auteurs (Shi *et al.*, 1995) dans une étude *in vitro* sur des cellules ovariennes de hamster ont montré que le sélénite de sodium et l'extrait de levure enrichie en sélénium protègent les cellules de la cytotoxicité de l'aflatoxine B<sub>1</sub> mais pas de la mutagénicité.

En revanche, McLeod *et al.* (1997) ont rapporté que des rats ayant reçu une alimentation déficiente en sélénium sont plus résistants à l'AFB<sub>1</sub> que ceux d'un régime alimentaire suffisant en sélénium. La protection contre l'AFB<sub>1</sub> lorsque le taux de sélénium est faible, est corrélé à l'expression d'enzymes hépatiques : l'aldo-céto réductase et la glutathione S-transférase. Ces deux enzymes sont responsables de la métabolisation cette mycotoxine.

### 2.3.3 Le sélénium et le DON

Faixova *et al.* (2007) ont évalué l'effet protecteur des produits enrichis en sélénium (0,4 mg de sélénium/kg d'aliment, levure enrichie en sélénium (1,4 mg de sélénium/kg d'aliment) pour contrer la toxicité du DON (0,2 et 3 mg/kg d'aliment) chez des poussins de poulets de chair pendant 6 semaines d'alimentation. Le taux de calcium, de chlorure et l'activité de l'alanine aminotransférase ont été élevés de façon significative dans le plasma des animaux ayant reçu dans leur alimentation du DON. Par contre, le taux de magnésium, de protéines totales, des triglycérides et du glycérol libre ont diminué dans le plasma des poussins. L'ajout de levure enrichie en sélénium dans l'alimentation a inversée les taux de calcium, de magnésium et l'activité de l'alanine aminotransférase induite par le DON. Le taux de phosphore, d'albumine, de cholestérol et l'activité de la phosphatase alcaline,

d'aspartate aminotransférase et de lactate déshydrogénase n'ont pas été affectée par l'alimentation. L'inclusion de sélénium à l'alimentation contaminée en DON, n'a toutefois pas complètement atténué l'effet toxique sur le métabolisme des protéines et des lipides dans le foie (Faixova *et al.*, 2007).

### 2.3.4 Le sélénium dans la prévention du cancer

Des études récentes montrent une association entre le Se, la diminution de dommages de l'ADN et le stress oxydatif. Les effets inhibiteurs *in vitro* de la sélénométhionine sur la croissance de trois lignées cellulaires tumorales humaines (MCF-7 : cancer du sein, l'UA-145 : cellules cancéreuses de la prostate et UACC-375 : mélanome) et contre les fibroblastes diploïdes humains normaux a été évalué par l'équipe de Redman *et al.* (1998). La croissance cellulaire de toutes les lignées cellulaires tumorales est inhibée de manière dose-dépendante en présence de la sélénométhionine (45 à 130 µM). Les fibroblastes diploïdes normaux sont moins sensibles que les lignées cancéreuses à l'effet inhibiteur de la sélénométhionine (1 mM). La sélénométhionine entraîne la mort cellulaire par apoptose, provoque des mitoses aberrantes, des changements dans le cycle cellulaire et perturbe le métabolisme des polyamines (médiateurs dans de nombreuses réponses cellulaires) (Redman *et al.*, 1998).

Le métabolisme de la sélénométhionine, contrairement à celle de sélénite, n'implique pas d'interaction avec le glutathion. La Sélénométhionine est convertie *via* la trans-sulfuration en sélénocystéine, qui est à son tour hydrolysée en sélénide d'hydrogène par la sélénocystéine-lyase (Ganther, 1986). La sélénocystéine inhibe la croissance des lignées tumorales humaines (A375 : mélanome, SW620 et colo 201 : adénocarcinome coloréctal ; HepG2 : carcinome hépatocellulaire, MCF7 et MDA-MB231 : adénocarcinome mammaires, HL60 : leucémie, et CN2 : carcinome du nasopharynx), en favorisant l'apoptose. Ceci est dû à l'induction d'espèces réactives de l'oxygène qui créent des coupures dans l'ADN (Chen et Wong, 2009). Le glutathion (5 mM), et la N-acétylcystéine (5 mM), inhibe la génération intracellulaire de ROS, et les coupures d'ADN dans les cellules MCF7 provoqués par le sélénocystéine (Chen & Wong, 2009).

### 2.3.5 Les produits commerciaux du sélénium et réglementation

Le sélénium se présente sous différentes formes organiques et inorganiques. Les formes organiques (comme la levure sélénée) ont l'avantage d'une disponibilité biologique relativement élevée. Il existe sur le marché des compléments alimentaires à base en sélénium, tel que le SeleniMAX® qui est constitué de sélénium (levure de sélénium/sélénite de sodium) 100 µg, de vitamine C 120mg, de vitamine E 30mg, de bêta-carotène 6mg, de zinc 20mg.

Les formes inorganiques et organiques de Se sont autorisées aux États-Unis. En Europe, deux sources inorganiques : Sélénate de sodium et Sélénite de sodium et, trois sources organiques sont autorisées. Selsaf (n° CE 3b8.12), levure sélénée issue de *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3399 produite par Lesaffre (levure testée au cours de cette étude), Alkosel (n°3b8.11), levure sélénée issue de *Saccharomyces cerevisiae* NCYC R 397 produite par Lallemand et Selplex (n° CE 3b8.10), levure sélénée issue de *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060 produite par Alltech.

La levure est constituée de levure morte (*Sacharomyces cerivisae*) naturellement enrichie en sélénium organique au cours du processus de fermentation.

La concentration en Se maximale autorisée dans les régimes alimentaires du porc dans l'Union Européenne est de 0,5 ppm ; des concentrations au-delà de 5 ppm peuvent réduire la consommation d'aliment et la croissance, surtout avec le Se inorganique (Mahan, 2000; Kim et Mahan, 2001).

Le NRC (1980) a fixé la dose maximale tolérable de Se de toutes les espèces à 2 mg/kg de matière sèche (ms) car cette dose ne produit pas de signes de toxicose.

### 2.3.6 Les levures enrichies en sélénium

L'alimentation supplémentée en Sel-Plex permet de réduire les dommages oxydatifs à l'ADN et à l'ARN chez les souris (Lovell *et al.*, 2009). Dvorska *et al.* (2007) ont évalué l'effet de la toxine T-2 sur le statut antioxydant des poulets et ont étudié les effets protecteurs des glucomannanes modifiés (Mycosorb™) et du sélénium organique (Sel-Plex™). L'inclusion de la toxine T-2 dans l'alimentation des poulets (8,1 mg/kg pendant 21 jours) a été associée à des baisses significatives dans



les concentrations de sélénium (Se) (de 32,2%), d' $\alpha$ -tocophérol (de 41,4%), de caroténoïdes totaux (de 56,5%), d'acide ascorbique (de 43,5%) et de glutathion réduit (de 56,3%) dans le foie, ainsi qu'une diminution de 36,8% de l'activité hépatique de la glutathione peroxydase Se-dépendant (Se-GSH-Px). L'inclusion des glucomannanes modifiés dans l'alimentation contaminée par la toxine T-2 a permis une protection partielle contre les effets néfastes de la mycotoxine sur les défenses antioxydantes dans le foie de poulet. Ces effets protecteurs des glucomannanes modifiés ont été associés à une réduction de 45% de la peroxydation lipidique dans le foie par rapport aux effets de la toxine T-2 seule. La combinaison des glucomannanes modifiés et le Se organique a montré une protection plus importante contre les effets de la toxine T-2 dans le foie de poulet (Dvorska *et al.*, 2007).

Juniper *et al.* (2008) a testé l'effet des levures Sel-Plex (*Saccharomyces cerevisiae*, CNCM I-3060) enrichies en sélénium (de 0,15 à 6,25 ; de 0,20 à 6,74 ; de 0,15 à 5,86 ; et de 0,14 à 6,63 mg de sélénium/kg de ms) sur la santé animale et la performance des vaches laitières, bovins, veaux, et agneaux respectivement. L'incorporation des levures enrichies en Se n'entraînent pas d'effets néfastes sur la santé animale, les performances et l'apport alimentaire volontaire, même à des concentrations en Se 10 fois supérieures à celle autorisée (0,568 mg de sélénium /kg de ms) par l'Union européenne (UE) (Juniper, 2008).

Une expérience sur une centaine de porcelets Landrace, a été menée pour évaluer l'efficacité de la levure enrichie en Se (Selsaf®, LFA, France) pour les porcs en croissance. Les performances productives, les paramètres sanguins hématologiques, de biochimie et le contenu de Se dans les tissus ont été utilisés comme critères de réponse. Les animaux ont reçu pendant 6 semaines des aliments de base supplémentés en sélénium (Se) : 0,650 ppm de sélénite de Na (0,3 ppm Se), 150 ppm (0,3 ppm Se) et 2500 ppm (5 ppm Se) de levures enrichies en Se (Selsaf®, LFA, France). Il a été observé que l'apport de Se alimentaire n'affecte pas les performances zootechniques ni les principaux paramètres sanguins. Au contraire, l'activité de la glutathione peroxydase (GSH-Px) et la concentration en Se du sang, des organes et des muscles sont fortement augmentées en fonction du taux de sélénium ingéré. La rétention dans le tissu musculaire est plus importante avec le Se organique qu'avec le Se inorganique. Ainsi, l'enrichissement de la viande de porc en Se est plus efficace avec les levures enrichies en Se. Il a été conclu que la levure sélénée est totalement sûre pour la croissance des porcs à la dose recommandée de 0,3 ppm et le Se a une efficacité similaire à celle de Na-sélénite. En outre, la levure sélénée est parfaitement adaptée pour augmenter le taux en Se musculaire et donc des propriétés antioxydantes, dans la viande de porc (Lizardo *et al.*, 2009).

### 3. Conclusion bibliographique

Différentes stratégies ont été examinées pour limiter les effets toxiques des mycotoxines, en utilisant des méthodes physiques, chimiques et des composés antioxydants tel que le sélénium, le glutathion, et les vitamines. Les stratégies nutritionnelles pour réduire la toxicité des mycotoxines semblent être l'approche la plus prometteuse à ce problème.

Dans le marché actuel, il y a un afflux de produits se revendiquant d'être efficace dans la lutte contre les effets néfastes causés par les mycotoxines. Dans certains cas, leur efficacité se base seulement sur des tests *in vitro* sans validation par une étude *in vivo*. En règle générale, les composés ayant des propriétés anti-oxydantes semblent être potentiellement très efficaces.

À ce jour, peu de méthodes sont proposées pour la détoxification multiple par différentes mycotoxines. La combinaison de plusieurs stratégies : biotransformation, adsorption, antioxydants procure une meilleure maîtrise des mycotoxines.

Dans cette thèse lors de notre étude expérimentale (voir chapitre III), nous avons combiné l'adsorption (levure) et l'utilisation des antioxydants. Nous avons testé l'effet des levures enrichies en glutathion ou en séléniométhionine comme agents protecteurs contre les mycotoxines (OTA et ZEA).

## **Matériels et Méthodes**

---

## 1. Extraction des mycotoxines et/ou leurs dérivés

Les méthodes analytiques pour le dosage des mycotoxines sont fondées sur plusieurs facteurs. Aucune méthode n'est directement applicable à tous les types de mycotoxines. Les paramètres primordiaux dans un schéma analytique sont la nature chimique de la ou des mycotoxines d'intérêt, ses groupes fonctionnels mais aussi le type de matrice dans laquelle elles sont recherchées.

Les aspects majeurs de l'analyse comprennent l'extraction à partir de la matrice, la purification et la concentration de l'extrait, la détection qualitative et quantitative des mycotoxines. De manière générale, la première étape d'extraction de la mycotoxine à partir de la matrice broyée, s'effectue dans un solvant organique aqueux (Scott, 1995). Les solvants utilisés dans l'extraction des mycotoxines peuvent être le méthanol, l'acétone, l'acétonitrile, l'acétate d'éthyl, et le chloroforme (Betina, 1993). L'utilisation d'un mélange d'eau et de solvant organique permet en humidifiant le substrat d'augmenter la pénétration du solvant. La phase aqueuse est généralement acidifiée afin de casser les interactions entre la ou les toxines et les constituants de l'échantillon tels que les protéines. L'utilisation de sels inorganiques permet de diminuer la formation d'émulsion durant l'extraction lors de cette première étape. D'autres composés peuvent être présents et interférer, par la suite, dans l'analyse chromatographique des mycotoxines. Une étape de purification à partir de l'extrait filtré est alors d'autant plus nécessaire que l'on cherche à atteindre des seuils de quantification le plus bas possible. Cette étape peut être réalisée soit par :

- Partage liquide-liquide (LLP),
- Extraction sur phase solide (SPE),
- Extraction sur colonne d'immunoaffinité (IAC).

La dernière étape est l'analyse par chromatographie des échantillons. Plusieurs techniques peuvent être utilisées :

- Chromatographie en couche mince (CCM ou TLC),
- Chromatographie liquide de haute performance (HPLC),
- Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) ou HPLC couplée à l'ionisation par électrospray (ESI).

La CCM présente l'intérêt de pouvoir détecter plusieurs toxines simultanément, mais les limites de détection sont trop élevées pour détecter des teneurs définies par les réglementations. Les techniques LC-MS ou ESI sont actuellement peu utilisées car ces technologies sont très coûteuses tant par l'acquisition de l'appareillage que par son entretien. La technique, la plus employée est l'HPLC (CAST, 2003), couplée à un détecteur UV [détection de la patuline et de l'acide pénicillique] (Hurst *et al.*, 1987) ou par fluorimétrie, notamment utilisée pour l'OTA et la CIT (Van Egmond, 1996 ; Franco *et al.*, 1996 ; Vail & Homann, 1990 ; Reinhard & Zimmerli, 1999)

### 1.1 Principe général des extractions des mycotoxines

Quel que soit le matériel utilisé (organe, urine, sang, surnageant cellulaire), le principe de la technique est fondé sur une extraction chloroformique acidifiée en présence de chlorure de magnésium. Le schéma général de l'extraction est donné dans la figure 45.

L'acidification et la force ionique de la solution d'extraction, permettent de rompre en partie les liaisons des toxines aux constituants de la matrice et favorisent ainsi leur extraction. L'extrait chloroformique obtenu est évaporé et filtré. Une méthode de purification est en place au laboratoire et consiste à réaliser une extraction de l'extrait chloroformique par du bicarbonate suivie d'une extraction au chloroforme supplémentaire.

L'étape d'extraction est un point primordiale car il peut y avoir une perte lorsque les toxines (ex : OTA/AF) sont fixées sur les protéines et donc seule la partie libre est dosée (voir thèse Molinié, 2004). Certaines mycotoxines peuvent se dégrader sous l'effet de la lumière/et ou la chaleur comme l'AFB<sub>1</sub>.

En ce qui concerne l'AF et l'OTA un autre problème majeur est l'extraction en milieu alcalin induisant l'ouverture du cycle lactonique. Ces formes ne sont plus reconnues par les anticorps spécifiques sur les colonnes d'immunoaffinité.

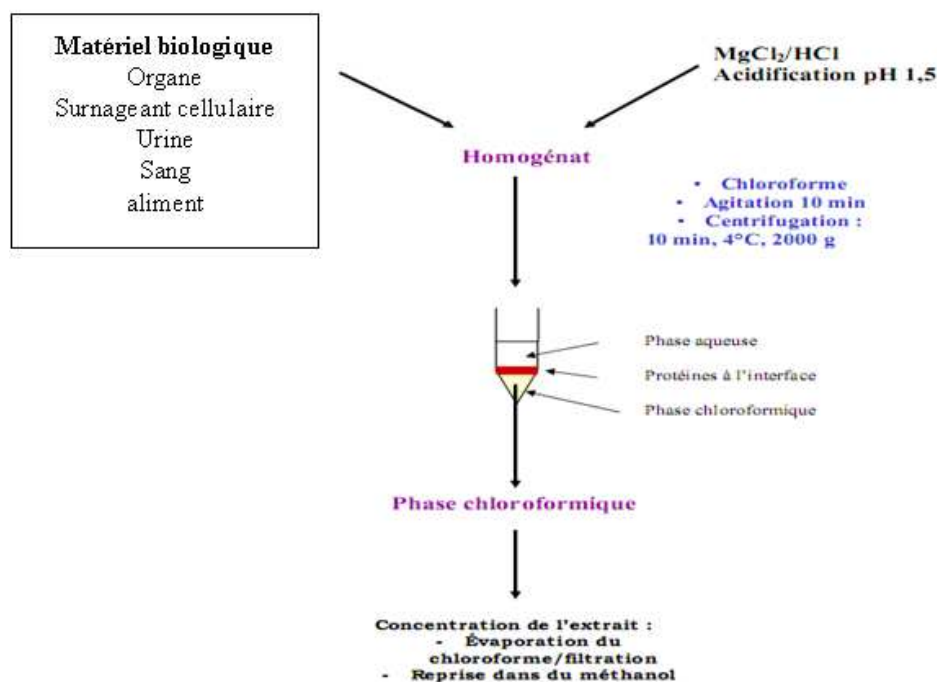


Figure 45 : Schéma de l'extraction des mycotoxines à partir de matériel biologique

## 1.2 Extraction de l'OTA à partir de différentes matrices alimentaires

Nous avons comparé deux méthodes d'extraction et d'analyse de l'ochratoxine A dans les céréales d'origine tchèques (orge et blé). La première est celle que nous utilisons en routine au sein de notre laboratoire. Celle-ci a déjà fait objet d'étude précédemment (thèse Molinié, 2004). La deuxième est la méthode officielle utilisée dans le laboratoire de Kromeriz en République tchèque.

Un certain nombre de pays ont établi des législations sur des mycotoxines. Afin de réduire le conflit entre les pays d'importation et d'exportation. La tendance actuelle dans l'analyse des mycotoxines est d'employer la colonne d'immunoaffinité (IAC) comme technique de purification et d'enrichissement, et l'association des chimistes analytiques officiels et de l'union européenne ont validé les méthodes utilisant des IAC pour quelques aliments.

Il a été constaté lors qu'autres études réalisées précédemment au sein de notre laboratoire que les sous-estimations peuvent être dues : (i) à l'interaction entre la mycotoxine et la matrice d'aliment (ii) l'instabilité des mycotoxines à la chaleur et/ou à la lumière (pour les aflatoxines) (iii) aux colonnes d'immunoaffinité (saturation, reconnaissance croisée de certaines formes des mycotoxines, etc).

Lors de l'analyse de céréales brutes (comme le maïs) et sur les céréales du petit déjeuner, il a été constaté que suivant les conditions d'extraction, une sous-estimation en AF, FB et OTA a été observée par non reconnaissance ou interférence avec les anticorps (voir Castegnaro *et al.*, 2006a).

### 1.2.1 Extraction de l'ochratoxine A par la méthode utilisée au sein de notre laboratoire (en milieu acide)

La première méthode d'extraction est réalisée en milieu acide et une purification par partition liquide-liquide, afin de permettre l'extraction simultanée de l'OTA, CIT et AF, et permet également de défixer les mycotoxines de leur liaison avec les protéines. Il s'agit d'une extraction par partition de phases (voir dans l'article El Adlouni *et al.*, 2000 ; Nguyen *et al.*, 2007).

Les étapes d'extraction et de purification de l'OTA et ses métabolites, CIT et AF par la méthode utilisée dans notre laboratoire en milieu acide sont résumées dans la figure 46.

Cinquante grammes de l'échantillon finement broyés sont mixées avec 400 ml de solvant d'extraction composé d'acétonitrile/eau (9 :1) (l'eau contient 4% de chlorure de potassium et 0,8 ml d'acide sulfurique concentré). Le mélange disposé dans un erlenmeyer de 500 ml, est placé sur un agitateur rotatif pendant 20 minutes.

L'extrait est filtré sous vide sur papier filtre Whatman n°4. Après filtration, une aliquot de 200ml de ce filtrat est dégraissé à deux reprises, par addition de 100 ml de n-hexane. Après agitation une minute, le filtrat dégraissé est placé dans une ampoule à décanter. Après une minute de décantation, la phase inférieure est récupérée dans un erlenmeyer de 250 ml.

Les mycotoxines sont extraites par 100 ml de chloroforme à partir de la phase inférieure acétonitrile/eau à laquelle 50 ml d'eau ultra pure ont été ajoutés. Le mélange acétonitrile/eau et chloroforme est agité mécaniquement pendant 10 minutes. Après une décantation de 10 minutes, la phase chloroformique (inférieure) est récupérée dans un erlenmeyer. La phase acétonitrile/eau (phase supérieure) est additionnée à deux reprises par 20 ml de chloroforme. Après agitation 10 minutes et décantation 10 minutes, la phase chloroformique contenant les mycotoxines est récupérée.

Au terme de ces trois extractions, les mycotoxines dissoutes dans les fractions chloroformiques sont extraits à trois reprises par adjonction de 50 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 5%. Après agitation (10 minutes) et décantation (10 minutes), la phase supérieure 'bicarbonate' contenant les mycotoxines est récupérée. Au terme des trois extractions par du bicarbonate, l'ensemble des fractions 'bicarbonates', réunis dans un même erlenmeyer. L'extrait est acidifié jusqu'à pH 1,5 par ajout d'acide chlorhydrique concentré. Finalement les mycotoxines sont extraites de ce mélange trois fois par du chloroforme (volumes de 100, 50 et 50 ml) ; après agitation (10, 5 et 5 minutes) et décantation (10 minutes à chaque étape d'extraction). L'extrait chloroformique (phase inférieure), contenant les mycotoxines, est récupéré dans un erlenmeyer. L'ensemble des extraits chloroformiques réunis sont évaporés (sous vide d'air) dans des ballons à fond conique de 50ml baignant dans un bain marie à 45°C. Quand le volume de chloroforme est réduit à environ 5 ml, le chloroforme est transféré dans un tube à hémolyse pour être évaporé sous flux d'azote millilitre par millilitre. Le ballon est rincé au chloroforme; le chloroforme de rinçage est également séché sous azote avec le reste du chloroforme.

L'extrait sec est remis en suspension dans 1 ml de méthanol et placé dans un bain à ultrasons pendant une minute. Quand la remise en suspension est totale, ce ml de méthanol est filtré sur un filtre de 0,2µm préalablement conditionné avec du méthanol. Le filtre est rincé avec 500µl de méthanol. Le méthanol filtré est placé dans un tube à hémolyse et le filtrat est séché au bain marie, sous flux d'azote. Une fois sec, l'extrait remis en suspension dans 500µl de méthanol est placé dans un flacon en verre parafilmé, conservé à -20°C en attendant d'être analysé par HPLC.

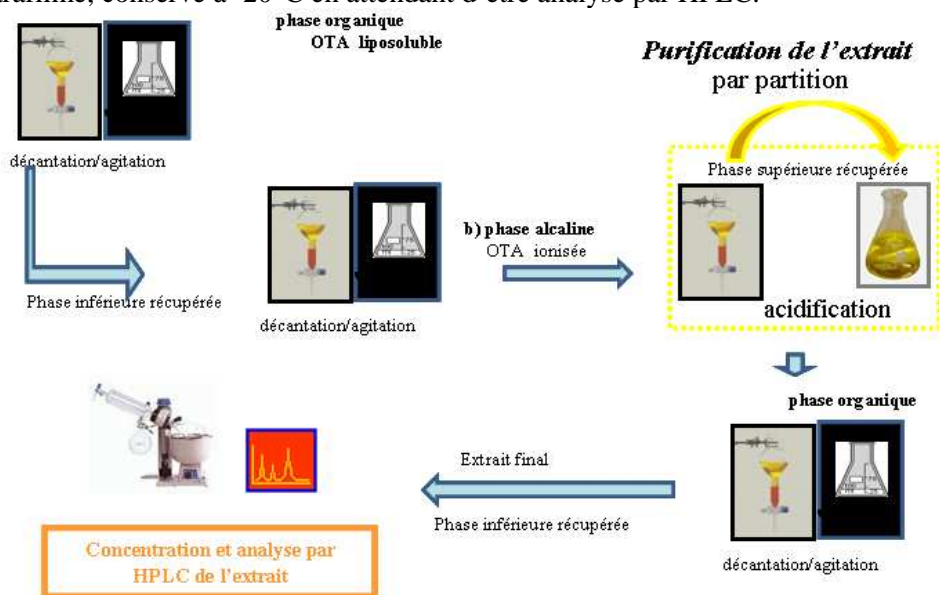


Figure 46 : Les étapes d'extraction et de purification de l'OTA et ses métabolites, CIT et AF par la méthode utilisée au sein de notre laboratoire (en milieu acide)

### 1.2.2 Extraction de l'OTA par la méthode officielle

La deuxième méthode est fondée sur l'utilisation des colonnes d'immuno-affinité (IAC) (OchraTest TM).

Cinquante grammes de l'échantillon sont extraits avec 100ml Acétonitrile-eau (60-40) par agitation d'une minute à grande vitesse. L'échantillon est filtré. 10ml du filtrat sont dilués avec 40 ml de PBS, et refiltrés par un filtre de microfibrilles. 10ml du second filtrat (équivalent à 1g) sont passés sur la colonne d'immunoaffinité (IAC) à 1 goutte par seconde. L'IAC est lavée avec 10ml de PBS, et 10ml d'eau distillée, ensuite séchée. L'éluion de l'OTA se fait par rajout de méthanol (1,5ml). Un millilitre et demi d'eau distillée sont ajoutés à l'éluât, agités et injectés 30-200µl à l'HPLC (figure 47).

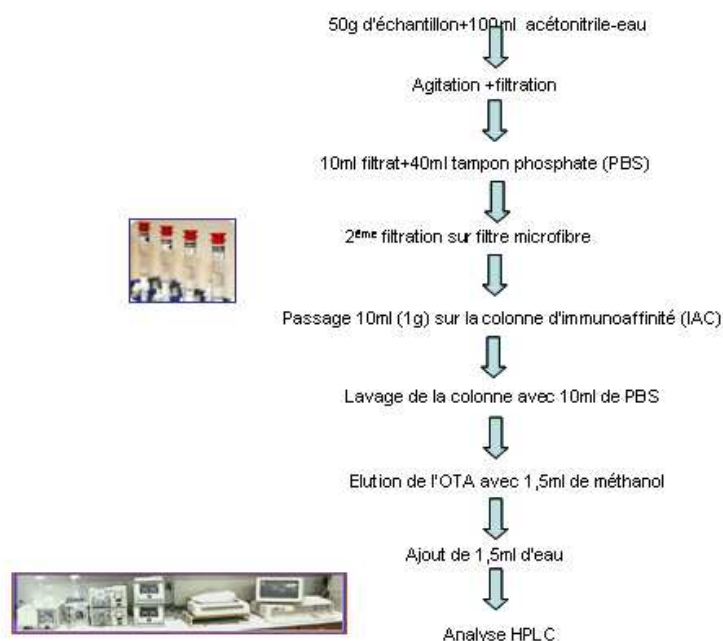


Figure 47 : Extraction de l'OTA par la méthode des colonnes d'immuno-affinité (IAC)

### 1.3 Méthode d'extraction de l'OTA et dérivés, CIT et AF à partir d'organes.

L'extraction est réalisée par broyage de 0,5g d'organe additionné de 10 ml d'un mélange de  $\text{MgCl}_2$  0,2M / HCl 0,1M initial volume à volume à pH 1,5. Le pH de la solution doit être égal à 1,5, dans le cas contraire, il est ajusté à l'aide de quelques gouttes d'HCL concentré. 10ml de chloroforme sont alors ajoutés au mélange et le tout est mis à agiter pendant 10 min. Une centrifugation de 10 min, à 4 °C, et à 5100g (Sigma 4K15), permet de séparer les phases aqueuse et chloroformique. A l'aide d'une pipette pasteur, la phase chloroformique inférieure contenant l'OTA et ses dérivés est récupérée et conservée. La phase aqueuse supérieure est à nouveau extraite avec 10ml de chloroforme selon les mêmes conditions que précédemment. Après centrifugation, les phases chloroformiques sont réunies et évaporées sous vide dans des ballons à fond conique baignant dans un bain marie à 45°C. L'extrait sec est remis en suspension dans 1 ml de méthanol et placé dans un bain à ultrasons pendant une 1minute. Quand la remise en suspension est totale, ce 1 ml de méthanol est filtré sur un filtre SPARTAN de 0,2µm préalablement conditionné avec du méthanol. Le filtre est rincé avec 500 µL de méthanol. Le méthanol filtré est placé dans un tube à hémolyse et le filtrat est séché au bain marie, sous flux d'azote. Une fois sec, l'extrait repris dans 300µL de méthanol, est placé dans un flacon en verre puis conservé à -20° C jusqu'à son analyse par HPLC.

### 1.4 Méthode d'extraction de l'OTA, et ses dérivés, CIT et AF à partir du sang

Un volume de 500 µl de sang total est prélevé et additionné de 2ml d'un mélange  $\text{MgCl}_2$  (0,2M) / HCl (0,1M) volume à volume dans un tube de 15 ml. Le pH de la solution doit être égal à 1,5, dans le cas contraire, il est ajusté à l'aide de quelques gouttes d'HCl concentré. Deux ml de chloroforme sont alors ajoutés au mélange et le tout est mis à agiter pendant 10 min. Une

centrifugation de 10 min, à 4 °C, et à 5100 g (Sigma 4K15), permet de séparer les phases aqueuse et chloroformique. A l'aide d'une pipette pasteur, la phase chloroformique inférieure contenant les toxines est récupérée et conservée. La phase aqueuse supérieure est à nouveau extraite avec 2 ml de chloroforme selon les mêmes conditions que précédemment. Après centrifugation, les phases chloroformiques sont réunies et évaporées sous vide dans des ballons à fond conique baignant dans un bain marie à 45 °C. L'extrait sec est remis en suspension dans 1 ml de méthanol et placé dans un bain à ultrasons pendant une minute. Quand la remise en suspension est totale, ce 1 ml de méthanol est filtré sur un filtre SPARTAN de 0,2 µm préalablement conditionné avec du méthanol. Le filtre est rincé avec 500 µL de méthanol. Le méthanol filtré est placé dans un tube à hémolyse et le filtrat est séché au bain marie, sous flux d'azote. Une fois sec, l'extrait repris dans 300µL de méthanol, est placé dans un flacon en verre puis conservé à -20° C avant son analyse par HPLC.

### **1.5 Méthode d'extraction de l'OTA et ses dérivés, CIT et AF à partir des surnageants cellulaires**

Trente ml de surnageant cellulaire additionné de 30 ml de  $MgCl_2$  (0,2M) / HCl (0,1M) à pH 1,5, sont extraits deux fois avec 30ml de chloroforme en suivant les même étapes que celles décrites précédemment. L'extrait final est repris dans 500µl de méthanol et conservé à -20°C.

### **1.6 Confirmation de la présence d'OTA par hydrolyse par la carboxypeptidase**

En cas de doute sur la présence d'OTA, nous réalisons le test à la carboxypeptidase qui va permettre l'hydrolyse de l'OTA en ochratoxine alpha ( $OT\alpha$ ) ayant des propriétés chromatographiques différentes. Une aliquote de l'échantillon est séchée dans un tube eppendorf de 2 ml sous vide. Vingt-cinq microlitres de carboxypeptidase A et 975 µL de solution de tris HCl (0,04 M, pH 2,5)/ NaCl (1M) sont ajoutés. Après une incubation de 2 heures à 37 °C, le milieu réactionnel est acidifié jusqu'à pH 2,5 par ajout d'acide chlorhydrique 1 M. Un ml de chloroforme est alors ajouté et l'ensemble est placé à agiter pendant dix minutes. Une centrifugation pendant 20 minutes, à 15°C, à 9000g (Sigma 1K15), permet de récupérer la phase chloroformique inférieure. Celle-ci est séchée et le culot est repris dans 500µL de méthanol.

### **1.7 Méthode d'extraction des fumonisines à partir de différentes matrices alimentaires (croquettes de chats et de chiens, riz, blé, orge,...)**

Vingt grammes d'aliments finement broyées sont mixées avec 50 ml de solvant d'extraction composé d'acétonitrile/méthanol/eau (25/25/50). Le mélange disposé dans un erlenmeyer de 500 ml, est placé sur un agitateur rotatif pendant 20 minutes. Le mélange est centrifugé à 5100 g (Sigma 4K15) pendant 10 minutes à une température de 4°C. L'extrait est filtré sous vide sur papier filtre Whatman n°4 (F1). Le culot est à nouveau extrait avec 50 ml de solvant d'extraction selon les mêmes conditions que précédemment. Après centrifugation, les filtrats sont réunis et homogénéisés. Dix ml du filtrat sont dilués avec 40 ml de tampon phosphate<sup>1</sup> (PBS 1) puis filtrés sur 3 papiers filtre Whatman n°4. Dix ml du mélange sont purifiés sur des colonnes d'immuno-affinité de fumonisine B<sub>1</sub> (figure 48).

Les colonnes sont placées à température ambiante au moins 30 minutes avant le début de la purification (I). Les 10mL d'extrait dilué sont chargés sur la colonne d'immunoaffinité à une vitesse maximale de 1-2 goutte par seconde (II). La colonne est rincée avec 10 ml de PBS. Les dernières gouttes de PBS1 sont récupérées en mettant sous vide pendant 30 secondes (III). La fumonisine B1 est éluée dans un tube à hémolyse en appliquant un volume total de 1,5 ml de méthanol sur la colonne (IV). La colonne est séchée totalement en appliquant le vide. L'élution est évaporée sous un faible débit d'azote au bain marie à 45°C jusqu'au séchage total du tube à hémolyse. Le résidu repris avec 200 µl d'acétonitrile/eau (50/50), est placé dans un flacon en verre puis conservé à -20°C avant son analyse par HPLC.

<sup>1</sup> : PBS1: [NaCl (8g) ;  $Na_2HPO_4$  (1,2g) ou (1.6g) si le produit est dihydraté ;  $KH_2PO_4$  (0.2g) ; KCl (0.2g) ; 990 ml d'eau, PH7 avec HCL concentré]

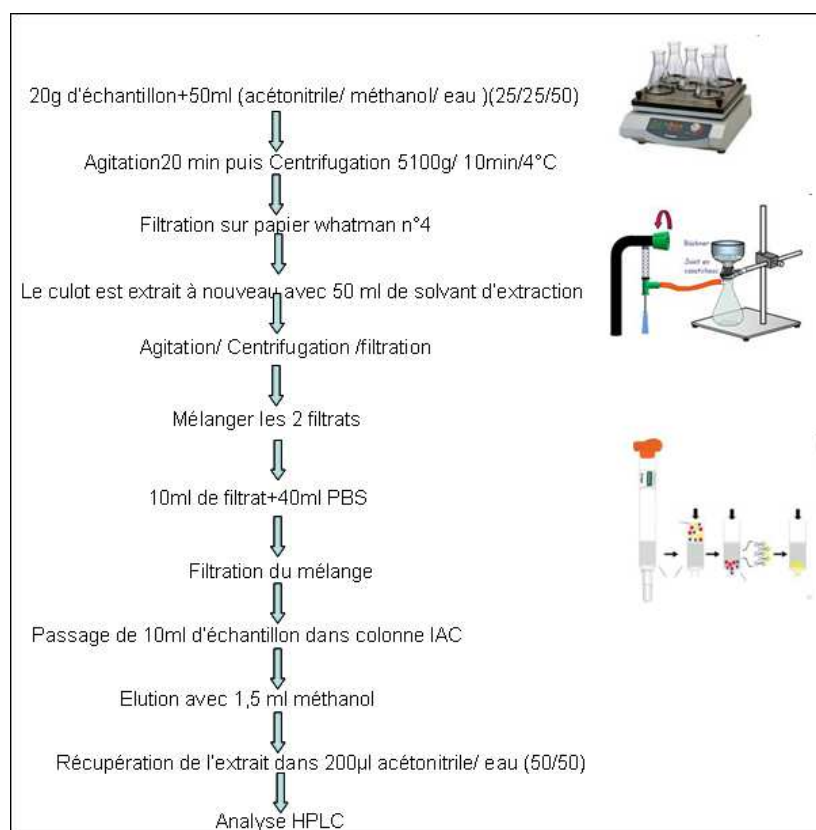


Figure 48 : Etapes d'extraction des fumonisines

#### Principe des techniques immuno-chimiques et description des méthodes utilisées

La technique repose sur l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé vers la mycotoxine recherchée. Les anticorps sont fixés sur un support inerte et ont pour fonction de « capturer » les molécules de toxines présentes dans l'extrait. Les ligands choisis (anticorps) doivent présenter différentes caractéristiques :

- Ils doivent être spécifiques,
- Le complexe anticorps-toxine formé doit être réversible pour permettre l'élution de la toxine avec un solvant adapté,
- Les ligands doivent être stables dans les conditions d'utilisation du test,
- L'anticorps doit présenter une affinité suffisante pour le substrat.

Le matériel utilisé pour la détection des fumonisines et de la zéaralénone est constitué de colonnes d'immuno-affinité (Biomin ou LIBIOS) sur lesquelles sont fixés les anticorps. Les étapes de l'analyse (schématisées dans la figure 49) sont les suivantes :

- extraction de la toxine,
- charge de l'échantillon sur la colonne,
- lavage de la colonne,
- élution de la toxine,
- quantification par HPLC.

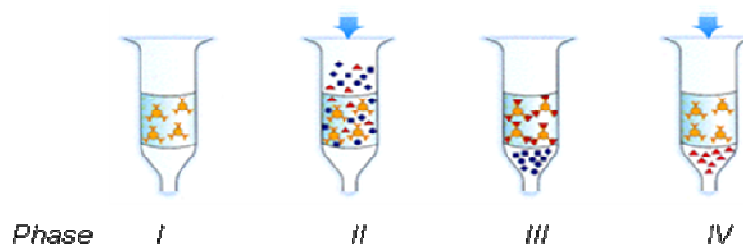


Figure 49 : Schéma des différentes étapes de la technique d'immuno-affinité. (particules jaunes : les anticorps greffés ; particules rouges : molécule de ZEA provenant de l'échantillon ; particules bleus : tampon (eau))



## 1.8 Méthode d'extraction des fumonisines à partir d'organes

L'extraction est réalisée par broyage d'environ 0,5g d'organe additionné de 10 ml de solvant d'extraction composé d'acétonitrile/méthanol/eau (25/25/50). Le mélange disposé dans un erlenmeyer de 250 ml, est placé sur un agitateur rotatif pendant 20 minutes. Le mélange est centrifugé à 5100 g (Sigma 4K15) pendant 10 minutes à une température de 4°C. L'extrait est filtré sous vide sur papier filtre Wattman n°4 (Filtrat 1). Le culot est à nouveau extrait avec 10 ml de solvant d'extraction selon les mêmes conditions que précédemment (Filtrat 2). Après centrifugation, les deux filtrats sont réunis et homogénéisés. La totalité du filtrat (20 ml) est dilué avec 30 ml de PBS, puis filtré sur 3 papiers filtre Whatman 4. Cinquante ml du mélange est purifié sur des colonnes d'immuno-affinité de fumonisine B1.

L'extraction des Fumonisines à partir du sang a été effectuée à partir de 500 µl, en suivant les mêmes étapes que celles décrites pour les aliments.

## 1.9 Méthode d'extraction de la zéaralénone à partir de différentes matrices alimentaires (croquettes de chats et de chiens, riz, blé, orge,...)

Vingt cinq grammes d'aliments finement broyées sont mixées avec 100 ml de solvant d'extraction composé d'eau /acétonitrile (1/3). Le mélange disposé dans un erlenmeyer de 500 ml, est placé sur un agitateur rotatif pendant 3 minutes. L'extrait est filtré sous vide sur papier filtre Whatman n°4. Douze ml du filtrat est dilué avec 88 ml de tampon phosphate<sup>2</sup> (PBS 2), puis filtré sur papier filtre Whatman n°4 (figure 50). Cinquante ml du mélange est purifié sur des colonnes d'immuno-affinité de zéaralénone.

Les colonnes sont placées à température ambiante au moins 30 minutes avant le début de la purification, puis conditionnées avec 20 ml du tampon phosphate. Cinquante ml d'extrait dilués sont chargés sur la colonne d'immuno-affinité à une vitesse maximale de 1-2 goutte par seconde (II). La colonne est rincée avec 20ml d'eau, puis séchée sous vide pendant 30 secondes (III). La zéaralénone est éluée dans un tube à hémolyse en appliquant un volume total de 1,5 ml d'acétonitrile sur la colonne (IV). La colonne est séchée totalement en appliquant le vide. L'élution est évaporée sous un faible débit d'azote au bain marie à 45°C jusqu'au séchage total du tube à hémolyse. Le résidu repris avec 500 µl de méthanol, est placé dans un flacon en verre puis conservé à -20° C avant son analyse par HPLC.

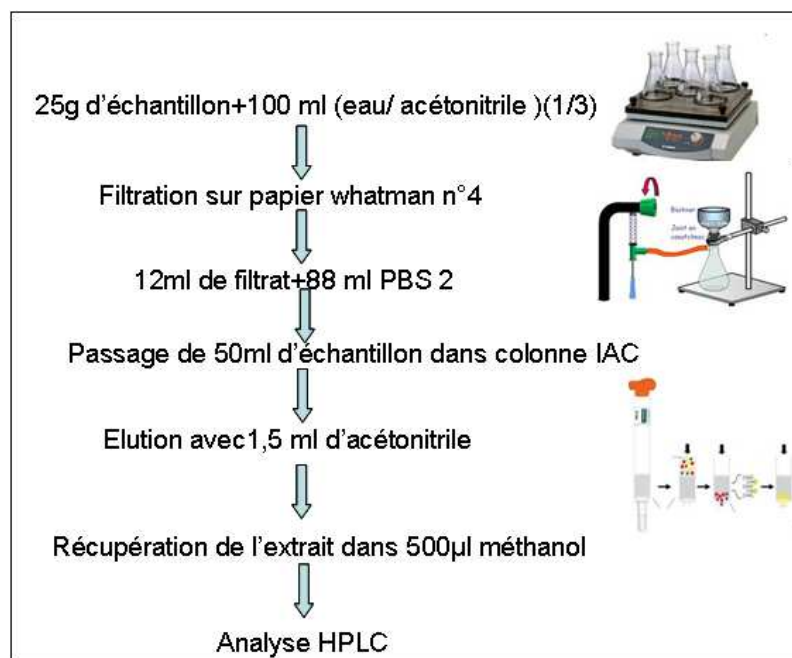


Figure 50 : Etapes d'extraction de la zéaralénone

<sup>2</sup>

PBS 2: [NaCl (8g) ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(1,2g) ou 1,6g si le produit est dihydraté ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0,2g) ; KCl (0,2g) ; 990 ml d'eau, PH7,4 avec HCl ]

### 1.10 Méthode d'extraction de la zéaralénone à partir d'organes

L'extraction est réalisée par broyage d'environ 0,5g d'organe additionné de 10 ml de solvant d'extraction composé d'eau /acétonitrile (1/3). Le mélange disposé dans un erlenmeyer de 250 ml, est placé sur un agitateur rotatif pendant 3 minutes. L'extrait est filtré sous vide sur papier filtre Whatman n°4. La totalité (10ml) du filtrat est dilué avec 40 ml de Tampon phosphate (PBS2), puis filtré sur papier filtre Whatman 4. Cinquante ml du mélange est purifié sur des colonnes d'immuno-affinité de zéaralénone.

L'extraction de la zéaralénone à partir du sang a été effectuée à partir de 500 µl, en suivant les mêmes étapes que celles décrites pour les aliments.

### 1.11 Méthode d'extraction du DON à partir des céréales

12,5 g de l'échantillon broyé sont pesés. L'extraction s'effectue par l'addition de 50ml Acétonitrile /Eau (42/8). Le mélange est agité pendant 3min. Après filtration, on complète l'échantillon à 50ml. Cinq ml d'extrait sont prélevés dans un tube à analyse. L'extrait est ensuite passé sur les colonnes MycoSep® 225 Trich. Ces colonnes contiennent un mélange de différents adsorbants et s'appliquent spécifiquement aux trichothécènes. 2ml d'extrait final sont évaporés et redissouts dans 400µl de phase mobile. L'échantillon est ensuite analysé par HPLC-MS.

### 1.12 Préparation des solutions standards de toxines

Les mycotoxines en poudre (OTA, OTB, OTHQ, AF, CIT, ZEA) sont solubilisées dans du méthanol ultra pur. Un milligramme de toxine est pesé sur la balance de précision et dissous dans un millilitre de solvant. Il est indispensable, dans le cas où les mycotoxines absorbent dans l'ultraviolet, de déterminer la concentration massique de la solution préparée en traçant le spectre UV selon le protocole décrit dans les méthodes de référence en tenant compte du coefficient d'absorption molaire associé au solvant de dilution.

Les solutions mères de mycotoxines (1mg/ml) sont diluées cent fois (10µg/ml) et la concentration de la solution diluée est déterminée avec précision par dosage de l'absorbance au spectrophotomètre selon les paramètres décrits dans le tableau 20.

Les mycotoxines (OTB, AF, CIT, ZEA) sont fournies par Sigma-Aldrich, France. L'OTHQ et l'OTQ-GSH sont fournies par le Pr. Manderville (Canada). L'ensemble du matériel de laboratoire en contact avec les mycotoxines est décontaminé par une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 4%.

Tableau 20 : Paramètres d'absorbance des mycotoxines

Nom de la toxine	abréviation	Poids moléculaire (PM) (g/mole)	Absorbance (nm)	Coefficient d'absorbance dans le méthanol (mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> .)
Ochratoxine A	OTA	403,8	330	5500
Ochratoxine B	OTB	369,3	321	5490
Ochratoxine A hydroquinone 1	OTHQ1	385	350	5952
Ochratoxine A dianionique	OTHQ2	385	396	11808
Aflatoxine B1	AFB1	312,27	362	21800
citrinine	CIT	250,3	321	5490
zéaralénone	ZEA	318,1	236	29700
Fumonisine B1	FB1		N'absorbe pas sous UV	

La loi de Beer-Lambert permet de déterminer la concentration en toxine de la solution après lecture de l'absorbance selon la formule :

$$DO = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Où  $l$  : est la largeur de la cuve en cm

$C$  : la concentration en toxine en mole/L

$\epsilon$  : le coefficient d'absorption molaire de la toxine en mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

### 1.13 Préparation de dérivés standard de l'OTA

#### 1.13.1 Préparation des formes OT $\alpha$ , OT $\beta$ et OTQ $\alpha$

L'OTA, l'OTB et l'OTHQ sont hydrolysées respectivement en OT $\alpha$ , OT $\beta$  et OTQ $\alpha$  sous l'action de la carboxypeptidase A. Un milligramme de chaque ochratoxine est pesé sur la balance de précision et remis en suspension dans 975  $\mu$ l de tampon (TrisHCl 0,04 M - NaCl 1 M, pH 6,4). 25  $\mu$ l de carboxypeptidase A sont ajoutés aux solutions de toxine et incubés 24 heures à température ambiante.

Afin d'extraire les formes OT $\alpha$  et OT $\beta$ , le mélange réactionnel est acidifié à pH 2,5 par addition d'environ 20  $\mu$ l d'HCl à 1M; 1ml de chloroforme est ajouté. Le mélange est agité pendant trois minutes puis centrifugé 20 min à 1500g (Sigma 1K15) à 15°C. La phase chloroformique inférieure est prélevée puis séchée par évaporation sous vide. L'extrait sec est dissout dans 500  $\mu$ l de méthanol et les solutions d'OT $\alpha$  et d'OT $\beta$  sont conservées à -20°C.

#### 1.13.2 Préparation des formes ouvertes des ochratoxines

Les formes ouvertes des ochratoxines A et B ainsi que de leurs dérivés OT $\alpha$  et OT $\beta$ , nommées respectivement OP-OA, OP-OB, OP-OT $\alpha$  et OP-OT $\beta$ , ont été préparées *in vitro* au laboratoire d'après le protocole de Xiao et al. (1996). La procédure est fondée sur le fait que le cycle lactone est hydrolysé en présence d'une base forte.

Un milligramme d'OTA ou d'OTB est pesé sur la balance de précision et remis en suspension dans 300  $\mu$ l de DMSO auxquels sont ajoutés 300  $\mu$ l de NaOH (1N). Les standards OT $\alpha$  et OT $\beta$ , qui sont déjà en solution dans du méthanol, sont séchés par évaporation sous vide puis le culot est repris par un volume de DMSO (diméthyle sulfo-oxyde) pour un volume de NaOH (1N). Le mélange réactionnel est incubé à température ambiante durant 24h, puis il est conservé à 4°C. Les solutions de standard seront diluées au moment de leur analyse en HPLC.

#### 1.13.3 Préparation de l'OTC et des formes méthylées et éthylées.

Les formes méthylées et éthylées de l'OTA, l'OTB, l'OT $\alpha$ , l'OT $\beta$  ont été préparées en présence respectivement de méthanol ou d'éthanol et d'un acide fort (HCl) d'après le protocole de Li *et al.* (1998). L'OTC a été préparée par estérification de l'OTA dans de l'éthanol en présence d'HCl 6N.

Un milligramme d'OTA ou d'OTB est pesé sur la balance de précision et remis en suspension dans 900  $\mu$ l de méthanol ou d'éthanol auxquels sont ajoutés 100  $\mu$ l d'HCl (6N).

Pour les standards déjà en solution dans du méthanol, il suffit d'ajouter un volume de (HCl (6N) pour 9 volumes de méthanol. Par contre pour obtenir les formes éthyl esters de ces standards, il est nécessaire de soigneusement les sécher par évaporation sous vide pour éliminer toute trace de méthanol puis de les redissoudre dans neuf volumes d'éthanol absolu (VWR) et un volume d'HCl. Le mélange réactionnel est incubé à température ambiante durant 24h, puis il est conservé à 4°C. Les solutions de standard seront diluées au moment de leur analyse en HPLC.

#### 1.13.4 Préparation des dérivés conjugués au glutathion ou à la N-acétyl cystéine (NAC)

La formation de dérivés conjugués au glutathion (GSH), ou à la N-acétyl cystéine (NAC) avec l'OTA et des dérivés d'OTA a été effectuée afin de produire des standards analytiques de ces métabolites. Ces standards pourront être utilisés pour détecter ces métabolites dans les échantillons biologiques, tels que les organes.

La formation des conjugués au GSH avec OTA et ses dérivés est produite suite à la réaction d'autooxydation de l'OTA, OTHQ et OTB.

Nous avons fait réagir l'OTA, OTB, l'OTHQ à des concentrations de 5, 10, 100, ou 200  $\mu$ M dans un tampon phosphate de 100mM (pH 7,4), avec 1 mM de GSH, à 37°C, (volume final de 500  $\mu$ l). Après 45 minutes d'incubation un aliquot de 20  $\mu$ l a été injecté dans l'HPLC.

## 2. Séparation et détection des mycotoxines et leurs métabolites

### 2.1 Produits et matériels

Le chlorure de potassium (KCl), le bromure de potassium (KBr), l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ), le chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ), l'acétate de sodium trihydraté ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), l'hydroxyde de sodium (NaOH) et l'acide sulfurique à 95% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) de qualité « pour analyse » sont fournis par VWR international, France. Le formate d'ammonium ( $\text{CH}_5\text{NO}_2$ ) provient de chez Acros Organics (Belgique). L'acide formique ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ) est de qualité ultrapure compatible avec la spectrométrie de masse ; il provient de VWR (France).

Le citrate de sodium di-hydraté, l'acide citrique monophosphate, le phosphate dissodique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), l'ophtaldéhyde sont fournis par SIGMA-ALDRICH. Le phosphate de sodium di-hydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) est fournie par VWR. L'acide acétique et l'acétate de sodium tri-hydraté sont fournis par PROLABO.

L'acétonitrile ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$ ), le chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ), l'acide chlorhydrique (HCl) à 37%, le méthanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ ), le propanol-2 ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ ), l'acide orthophosphorique à 85% ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) et l'acide acétique glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) sont des solvants de qualité ultrapure, compatibles avec une analyse HPLC : ils sont fournis par ICS (France) sous la marque Scharlau Chemie S.A (Barcelone, Espagne).

L'ensemble des solutions est préparé avec de l'eau milliQ, ultra-purifiée et déminéralisée.

Les membranes en nylon de  $0,45\mu\text{m}$  utilisées pour le dégazage des phases mobiles, les flacons en verre d'une contenance de 1,5 ml, les flacons en plastique de  $250\mu\text{L}$  ainsi que l'ensemble des consommables HPLC (joints, capuchons, raccords...) sont fournis par ICS, France.

Les filtres  $0,2\mu\text{m}$  SPARTAN RC 13 mm utilisés pour la filtration des échantillons avant leur passage en HPLC, sont fournis par Schleicher & Schuell, France.

La verrerie de laboratoire (erlenmeyer, éprouvettes graduées, fioles jaugées, pipettes), est distribuée par VWR international.

La carboxypeptidase A, d'origine pancréatique bovine à 1000 unités/ml, et le trizma base sont fournis par Sigma-Aldrich, France.

Les tubes en polypropylène de capacité 15 et 25 ml sont fabriqués par Falcon et distribués par Becton-Dickinson, France.

Les colonnes d'immuno affinité pour la zéralénone sont fournies par BIOMIN et LIBIOS.

Les kits ELISA pour la détection du DON sont fournis par LIBIOS France et RBIOPHARM

### 2.2 Appareillage

L'eau milliQ ultrapure est obtenue après passage d'eau distillée sur une cartouche de charbon actif, deux colonnes échangeuses d'ions et une machine Barnstead fournies par Fisher Bioblock, France.

Un spectrophotomètre UV (Anthelie 5 advanced) de la marque SECOMAM sert à quantifier les solutions standards de mycotoxines.

L'agitateur orbital Heidolph unimax 2010 est fourni par VWR international, France. Le bain à ultra-sons est de la marque NEY. L'évaporateur rotatif avec un bain thermostaté est de la marque Buchi.

La centrifugeuse à évaporation sous vide "Speedvac concentrator", adaptée pour la réception des tubes eppendorf, provient de chez Savant.

La centrifugeuse réfrigérée Sigma 1K15 et adaptée pour la réception des tubes eppendorf, provient de chez Fisher Bioblock Scientific, France.

La centrifugeuse réfrigérée Sigma 4K15 et adaptée pour la réception de tubes de type Falcon de capacité 50 et 15 mL provient de chez Fisher Bioblock Scientific, France.

Les pompes alimentant le système en phase mobile sont distribuées par ICS, France.

## 2.3 Analyses par Chromatographie en phase Liquide de Haute Performance (HPLC)

### 2.3.1 Principe de l'HPLC

La Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance ou HPLC est une technique analytique qui permet la séparation d'un ou de plusieurs composés, contenus dans un mélange, en vue de leur caractérisation et de leur quantification : le système permettant d'effectuer cette séparation est appelé système de phases et est composé de la phase stationnaire et de la phase mobile. La méthode de chromatographie HPLC utilisée pour la séparation et la caractérisation des mycotoxines est la chromatographie d'adsorption en phase inverse. La phase stationnaire utilisée est constituée de groupements C<sub>18</sub> greffés sur un support de silice.

### 2.3.2 Description du système HPLC

La chaîne HPLC est constituée de divers éléments schématisés ci-après sur la figure 51 :

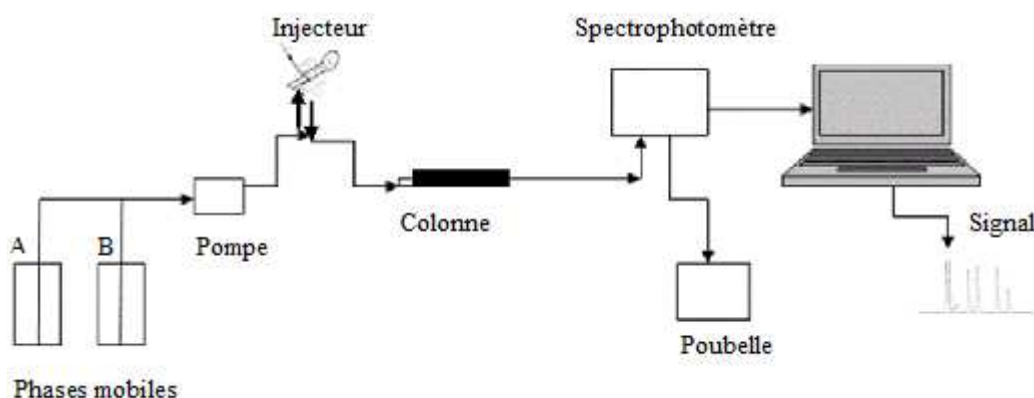


Figure 51 : Schéma d'une chaîne HPLC.

La phase mobile alimente le chromatographe en permanence : elle est délivrée dans le système par une pompe dont le débit est modulable. Les composés à séparer, en suspension dans un solvant, sont prélevés grâce à une seringue puis chargés dans le chromatographe par l'injecteur au niveau de la boucle d'injection. Les molécules sont entraînées par la phase mobile vers la colonne chromatographique contenant la phase stationnaire. L'affinité des composés pour la phase stationnaire déterminera leur rétention. Un détecteur fluorimétrique suit en permanence l'élution du composé et le signal obtenu est enregistré au niveau de l'ordinateur. Une bonne séparation des composés d'intérêt, grâce à l'utilisation de phases mobiles et stationnaires adaptées à ceux-ci, permettra d'observer au niveau de l'intégrateur un pic isolé, fin et symétrique dont la surface est fonction de la concentration de la solution analysée en ce composé.

La phase stationnaire utilisée pour toutes les analyses est constituée d'une colonne chromatographique ProntoSil (25 cm \* 0.4 cm) 120-3-C<sub>18</sub>. En amont de la colonne chromatographique est placée une précolonne (ULTRASEP) de silice portant des greffages C<sub>18</sub>, de longueur 1 cm et de granulométrie 10µm. La colonne et la pré-colonne sont fabriquées par Bischoff, et fournies par ICS, France.

La détection des fumonisines est assurée par un fluorimètre Hitachi, F1 detector L-7485 Lachrom distribué par Marck. La chaîne possède un injecteur manuel de la marque ICS.

La détection des autres mycotoxines est assurée par un fluorimètre Shimadzu RF-10AXL.

L'enregistrement et l'analyse des chromatogrammes sont effectués par un logiciel adapté (Normasoft), commercialisé par ICS, France.

La concentration en mycotoxines est calculée à l'aide d'une courbe d'étalonnage préalablement établie avec des solutions de mycotoxines de concentrations connues.

### 2.3.3 Analyse HPLC pour la détection de l'OTA, ses dérivés et la CIT

Lors de la première utilisation, la colonne chromatographique est conditionnée toute une nuit par le passage d'un mélange d'acétonitrile/eau (85/15, v/v) à un débit de 0,24 ml par minute. Elle est ensuite conditionnée pendant 30 minutes par passage de la phase mobile utilisée pour l'analyse à un débit de 0,5 ml par minute lors de l'utilisation en mode isocratique. En mode gradient, la colonne est conditionnée pendant 30 minutes par passage de la phase A à un débit de 0,5 ml/min puis un premier cycle est réalisé. Des standards externes, correspondant à des solutions de mycotoxines pures, sont injectés intercalés dans la série d'échantillons, pour s'assurer de la bonne calibration et d'une éventuelle dérive du temps d'élution.

#### 2.3.3.1 Paramètres d'analyse HPLC

La phase mobile est délivrée par la pompe à un débit défini en fonction de la phase utilisée, afin d'obtenir une pression, variable lors de l'utilisation de la chaîne HPLC en mode gradient, de 20mPa à maximum 30mPa dans la colonne chromatographique. Le volume d'échantillon prélevé et injecté soit manuellement, soit automatiquement selon la toxine recherchée (vanne d'injection rhéodyne de chez ICS) dans le système est de 20µL. Différents types de phases mobiles sont utilisés en fonction des mycotoxines à analyser.

#### 2.3.3.2 Analyses HPLC réalisées en conditions isocratiques

La composition de la phase mobile identique sur toute la durée de l'analyse. Nous avons utilisé pour l'analyse dans les aliments la phase suivante : 600 mL acide Ortho-phosphorique ( $H_3PO_4$ ) à 0,33M, 400 mL Acétonitrile et 50 mL Propanol-2.

Cette phase permet la séparation et la quantification de l'OTA, de ses métabolites ainsi que de la CIT. L'élution dure 35 minutes. Pour l'OTA et ses dérivés, la détection au spectrofluorimètre est réalisée avec une longueur d'onde d'excitation de 330nm, et une longueur d'onde d'émission de 465nm. Pour la détection de la CIT, les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont respectivement 331nm et 500nm.

#### 2.3.3.3 Analyses HPLC réalisées en conditions de gradients

Cette phase a été utilisée pour l'analyse des métabolites dans les fluides biologiques et dans les surnageant cellulaires.

La détection se fait par fluorimétrie (excitation 330 nm, émission 465 nm).

La composition de la phase mobile varie, au cours de l'analyse, d'un solvant A à un solvant B dans des proportions déterminées au préalable.

Le gradient «1» mise au point par Faucet-Marquis (2005) a été utilisé pour l'analyse de l'OTA et de ses métabolites. Les phases A et B sont composées comme décrit ci-dessous.

Solvant A: 200 mL Méthanol, 200 mL Acétonitrile, 600 mL eau, formate d'ammonium 0,34g (6,5mM), acide formique jusqu'à pH 3,5

Solvant B: 350 mL Méthanol, 350 mL Acétonitrile, 300 mL eau, formate d'ammonium 0,34g (6,5mM), acide formique jusqu'à pH 3,5

Le gradient « 1 » est le suivant : à 0 minute 100% A, à 10minutes 100% A, à 25 minutes 30% A, à 45 minutes 0% A, à 55 minutes 0% A, et à 58 minutes 100% A.

L'évolution de la concentration de ce gradient, en chacune de ces deux phases, au cours de l'analyse est présentée ci-après (figure 52).

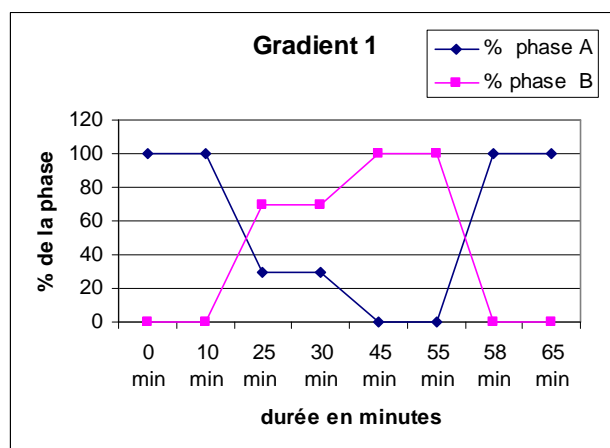


Figure 52 : Schématisation de gradient utilisé en HPLC, gradient «1» (Faucet-Marquis, 2005).

L'élution dure 65 minutes et permet la séparation des différents métabolites (figure 53). Les temps de rétention de l'OTA et de ses métabolites sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Tableau 21 : Temps de rétention en minutes de l'OTA et des métabolites identifiés de l'OTA après séparation utilisant le gradient «1».

Métabolites	Temps de rétention en minutes
OT $\beta$	8,5
Ota	18,5
DC-OTHQ (decarboxylé et déchloré OTA)	25,5
OP-OA	28
10 R OH-OTA	30
4-S-OH-OTA	30,2
4 R-OH OTA	32,5
OTHQ (forme quinone de l'OTA)	34 & 36
OTB	33,4
OTA	42
Méthyl OTA	53

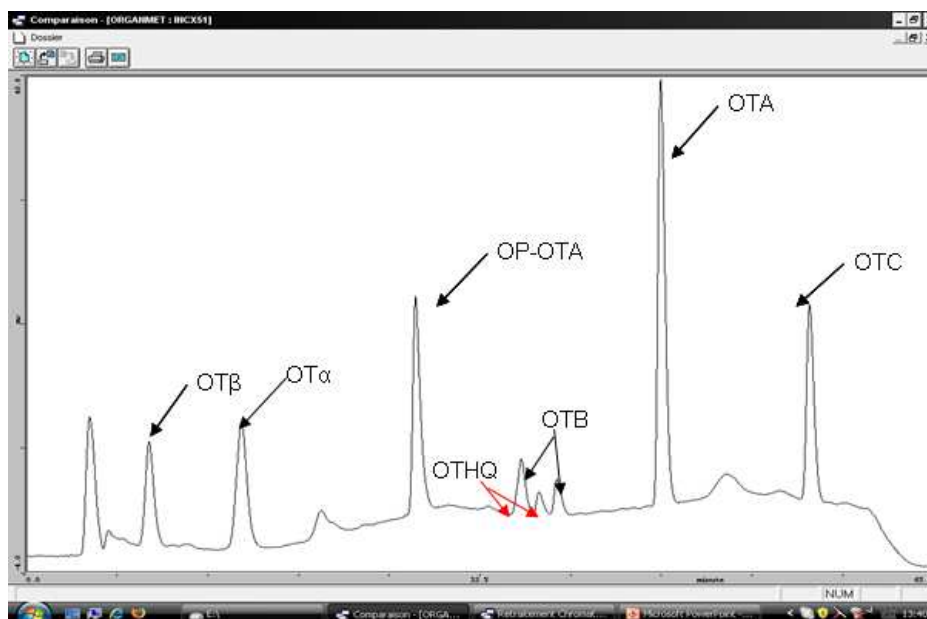


Figure 53 : Profil HPLC de l'OTA et ses métabolites

Pour l'analyse des métabolites dans les surnageants cellulaires traités avec OTA et ZEA, un nouveau gradient « 2 » a été utilisé. La composition de la phase mobile est la même que celle décrite au-dessus.

L'analyse HPLC dure 85 minutes et permet la séparation de l'OTA et ZEA ainsi que leurs métabolites respectifs (figure 55 et tableau 22).

Le gradient « 2 » est le suivant : à 0 minute 100% A, à 15 minutes 100% A, à 25 minutes 65% A, à 40 minutes 65% A, à 60 minutes 0% A, à 70 minutes 0% A et à 75 minutes 100% A (figure 55).

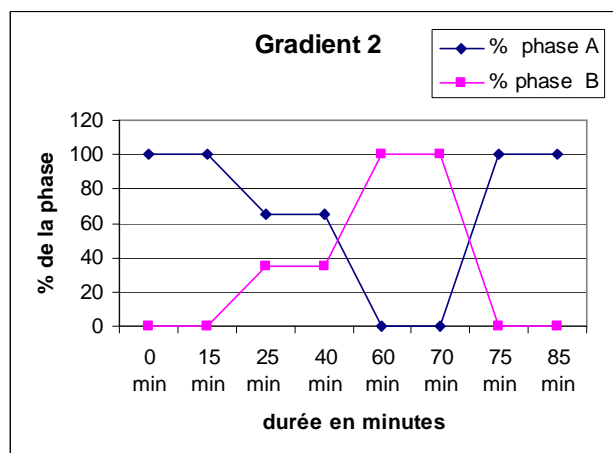


Figure 54 : Schématisation du gradient utilisé en HPLC, gradient « 2 »

Tableau 22 : Temps de rétention en minutes de ZEA et de ses métabolites identifiés et l'OTA après séparation utilisant le gradient « 2 ».

Métabolites	Temps de rétention en minutes
OTA (ochratoxine A)	67,8
ZEA (zéarélénone)	66,7
$\alpha$ ZOL $\alpha$ (zéarélénone)	60,8
$\beta$ ZOL ( $\beta$ zéarélénone)	51,9

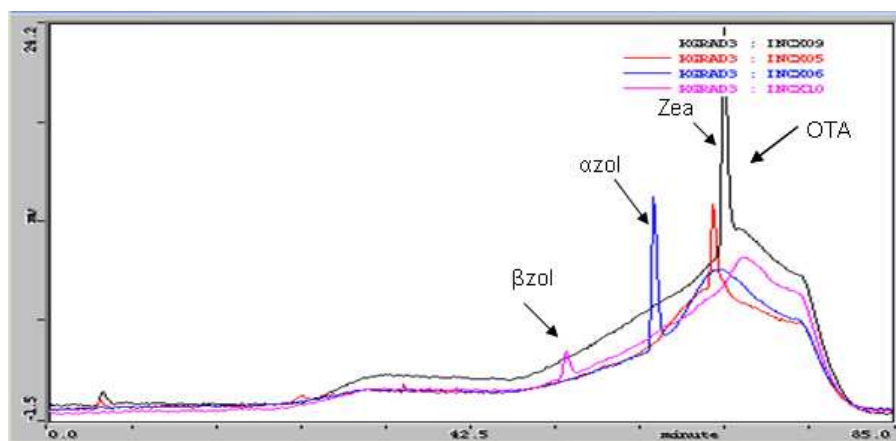


Figure 55 : profil HPLC de la ZEA et ses métabolites

### 2.3.4 Analyses HPLC pour la détection des aflatoxines

La présence d'aflatoxines dans un échantillon par HPLC s'effectue par dérivation des aflatoxines B<sub>1</sub> et G<sub>1</sub>. Ceci est nécessaire afin d'augmenter leur fluorescence naturelle sous lumière UV, et de pouvoir accroître la sensibilité du dosage.

Le principe de cette technique est de délivrer à la **KOBRA Cell®** la phase mobile provenant de la colonne HPLC, contenant les aflatoxines et l'agent précurseur de dérivation : le bromure de potassium. Le branchement de la **KOBRA Cell®** sur le courant va permettre d'appliquer un potentiel



constant au niveau de l'électrode de travail, et ainsi de générer électrochimiquement du brome qui va se fixer sur les aflatoxines B<sub>1</sub> et G<sub>1</sub>. Les dérivés bromés des aflatoxines B<sub>1</sub> et G<sub>1</sub> vont présenter une fluorescence supérieure à celle produite naturellement (figure 56).

Phase mobile : méthanol: acétonitrile: eau (20:20:60% v/v), débit de 1 ml/mn.

A un litre de phase mobile, additionner 119 mg de bromure de potassium et 350 µl d'acide nitrique 4M. La détection des aflatoxines est effectuée aux longueurs d'ondes : d'excitation à 362 nm et d'émission à 425 nm pour B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> et à 455 nm pour G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>.

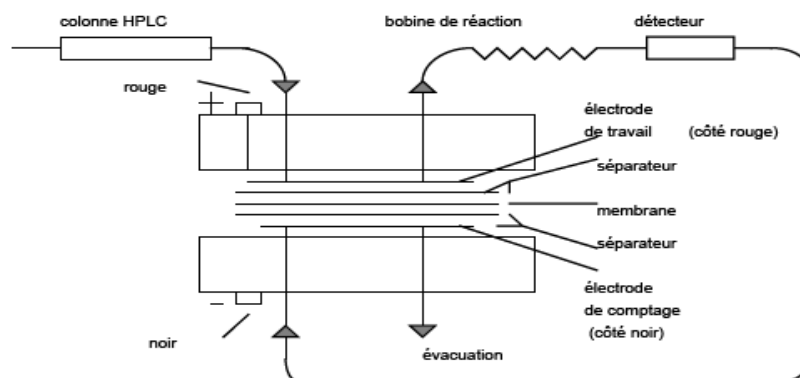


Figure 56 : Schéma des connexions du Kobra Cell® (Cellule électrochimique pour la dérivation des aflatoxines par HPLC).

### 2.3.5 Analyses HPLC pour la détection des fumonisines

La méthode utilisée pour l'analyse des fumonisines est celle qui a été validée par l'étude interlaboratoire 1999-2000 au niveau des communautés européennes et de l'AOAC (Visconti *et al.*, 2001).

L'analyse HPLC est effectuée après la dérivation de la fumonisine par l'Ortho-phthaldialdéhyde (OPA).

A 50 µl de solution de FB ou d'échantillon, on ajoute 50 µl d'OPA et on agite 30 secondes au vortex. On attend exactement 3 minutes et on injecte en HPLC.

La phase mobile est constituée de méthanol : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M (80-20) ajusté à pH 3,35 par H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. La détection se fait par fluorimétrie (excitation 335 nm, émission 440 nm).

### 2.3.6. Analyses HPLC réalisées pour la détection de la zéaralénone.

La détection se fait par fluorimétrie avec une longueur d'onde d'excitation de 275 nm, et une longueur d'onde d'émission de 450nm. La phase mobile est constituée d'acétonitrile/eau (70/30).

## 2.4 La détection du DON

Nous avons eu recours à deux méthodes d'extraction et de dosage du désoxynivalénol (DON) dans des matrices alimentaires : la spectroscopie de masse et les kits ELISA.

Le but de ce travail était de comparer une méthode rapide mais limitée (ELISA) et une méthode connue pour sa fiabilité (HPLC-MS) mais longue et coûteuse.

### 2.4.1 Analyse du DON par spectroscopie de masse (MS)

#### 2.4.1.1 Principe

La contribution de la spectrométrie de masse aux connaissances actuelles en biologie reste encore relativement modeste. Cependant, la spectrométrie de masse en mode électrospray (ESI pour ElectroSpray Ionization) est maintenant considérée comme essentielle dans ce domaine. Bien que le mécanisme de l'électrospray ne soit pas encore bien élucidé, le processus peut être simplement décrit.

Une solution d'échantillon est introduite dans un capillaire qui est porté à un haut potentiel électrique. Le champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse.

Pendant ce transport, la taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant par explosions "coulombiennes" successives (divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites, provoquées par une charge surfacique très élevée) (voir figure 57).

L'application d'une pression à l'entrée du capillaire peut faciliter la nébulisation, suivant le débit utilisé et la composition du solvant (Gaskell, 1997). De plus, un flux de gaz (de l'azote en général) peut être appliqué à l'interface pour aider à l'évaporation du solvant. Certaines interfaces sont aussi chauffées. Les ions formés sous pression atmosphérique sont alors canalisés par un ensemble d'échantillonneurs, c'est-à-dire un ensemble d'orifices sous pompage, vers l'analyseur où règne un vide poussé. L'analyseur permet de filtrer les ions en fonction de leur rapport  $m/z$ . Différents types d'analyseurs existent, comme les analyseurs quadripolaire ou en temps de vol. Nous avons utilisé un analyseur à piège à ions.

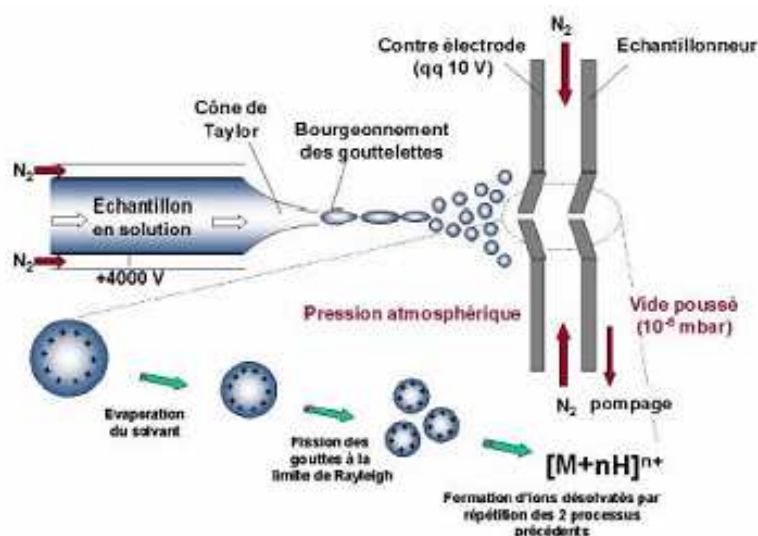


Figure 57 : Processus d'électrospray (ESI)- Schéma de principe (d'après Gaskell, 1997).

#### 2.4.1.2 Description du système.

L'analyse du DON dans les croquettes de chat et de chien d'élevage par spectroscopie de masse a été effectuée lors de mon stage en République Tchèque dans le cadre d'une collaboration (voir résultats chapitre I).

Douze grammes et demi d'échantillon sont broyés. L'extraction s'effectue par l'addition de 50ml acétonitrile/eau (42v/8v). Le mélange est agité pendant 3 minutes puis filtré. L'extract est complété jusqu'à 50ml. Cinq ml d'extract sont purifiés sur des colonnes MycoSep®225 trich. Ces colonnes contiennent un mélange de différents adsorbants et s'appliquent spécifiquement aux tricothécènes. Deux ml d'extract final sont évaporés et redissoutes dans 400µl de phase mobile. L'échantillon est ensuite analysé par HPLC-MS.

Les analyses par spectrométrie de masse (MS) ont été réalisées sur un spectromètre de masse HP 1100 (Agilent technologies, Palo Alto, USA), composé de l'unité de dégazage sous vide (model G1322A), pompe quaternaire (G1311A), échantillonneur automatique (G1313A) et spectromètre de masse avec ionisation par électronébulisation (electrospray ionization) a été utilisée. Le ChemStation logiciel (Rev.A10.02) contrôlant le système chromatographique a été utilisée pour l'évaluation des chromatogrammes.

La détermination analytique du DON a été réalisée sur une colonne chromatographique à phase reverse (LUNA 250x4.6 mm, 5µm ; phenomenex, USA).

Le DON a été détecté sur un spetre de masse (MS) sous forme d'ions de charge positive :  $[DON+H]^+$ ,  $m/z=297$  et  $[DON+Na]^+$ ,  $m/z=319$ .

Le temps d'analyse est de 15 minutes, le DON est élué à 10,9 minutes. La séparation est effectuée à température ambiante du laboratoire.

La phase mobile est constituée de d'acide formique 1mM/ acétonitrile (90/10) à un débit de 1ml/min.

## 2.4.2 Analyse du DON en utilisant le test ELISA

### 2.4.2.1 Principe

Le test ELISA (acronyme d'Enzyme *Linked Immuno Sorbent Assay*) est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique.

Les puits de microplaque en polystyrène greffés avec des anticorps purifiés et biochimiquement caractérisés sont utilisés comme phase solide contenant les anticorps immobilisés.

Lorsque l'échantillon est positif, les antigènes spécifiques dans l'échantillon de sérum dilué se lient aux anticorps couplés à la phase solide.

Dans une seconde étape, les anticorps liés sont détectés avec des anticorps anti-immunoglobulines humaines couplés à la peroxydase.

Dans une troisième étape, les anticorps liés sont rendus visibles en utilisant une solution chromogène/substrat capable de générer une réaction colorée. L'intensité de la coloration produite est proportionnelle à la concentration de l'anticorps dans l'échantillon de sérum.

### 2.4.2.2 Dosage du DON par le kit ELISA

Le test est réalisé sur une plaque de microtitration recouverte avec des anticorps anti-désoxynivalenol ce qui constitue la phase solide. Les standards ou les échantillons et l'enzyme conjuguée DON-peroxydase sont ajoutés à chaque puits.

Lors de la première incubation (figure 58), il y a une compétition entre le DON libre contenu dans l'échantillon ou le standard et la DON conjuguée à l'enzyme pour les sites de liaison aux anticorps anti-DON. Suite à cette première incubation, les molécules non liées sont éliminées par lavage. L'enzyme conjuguée qui est liée à la phase solide est révélée par addition d'une quantité donnée de substrat chromogénique. L'enzyme convertit le chromogène incolore en un produit bleu. L'addition d'un réactif stop permet la conversion de la couleur bleue en jaune. L'absorbance est ensuite mesurée par lecture à 450 nm. L'intensité colorimétrique est inversement proportionnelle à la concentration de DON dans l'échantillon.

Cette technique de dosage du DON par test ELISA a été effectuée sur les échantillons de croquettes de chat provenant de l'industriel (voir résultats chapitre I).

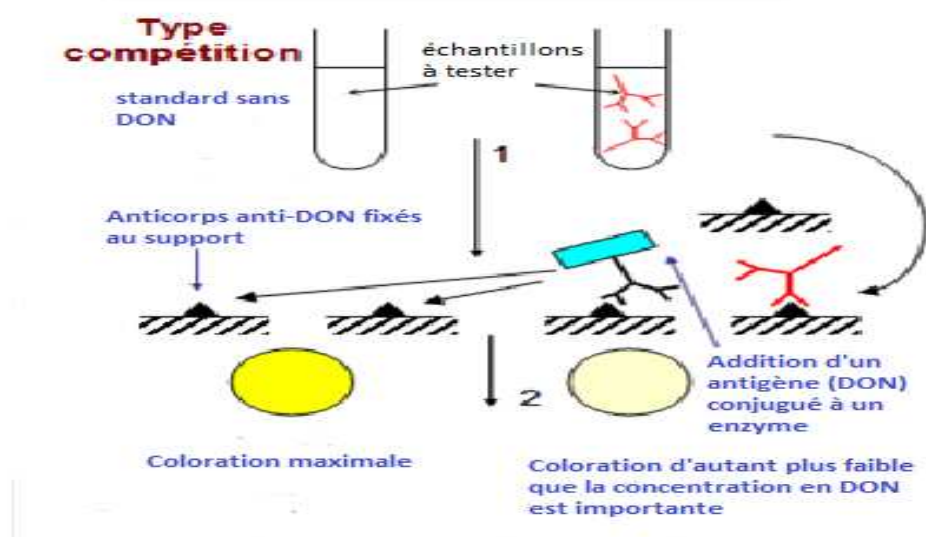


Figure 58 : Principe du test ELISA

## 2.5 Rendement de récupération et limites de détection et de quantification

Nous avons défini dans les conditions analytiques décrites précédemment, les rendements d'extraction, les limites de détection et de quantification de chaque des toxines.

Afin de déterminer le rendement, nous a effectué des sur-contaminations de plusieurs échantillons à des concentrations de 3 ou 5 µg de chaque mycotoxine/kg de d'aliment.

Le rendement de récupération de la ZEA et de la FB<sub>1</sub> sur des colonnes d'immunoaffinité est de 80% et 68 % respectivement. Le rendement de récupération de l'OTA, la CIT et l'AFB<sub>1</sub> dans les aliments est de 78%, 70% et 85 % respectivement.

Les pourcentages de récupération des toxines sont en accord avec la législation européenne en vigueur (n° 472/2002, 2002b) qui a défini les caractéristiques de performance pour l'OTA. Pour des teneurs allant de 1 à 10 µg/kg, le taux de récupération doit être compris entre 70 et 110 % avec une  $RSD_r \leq 20\%$  et  $RSD_R \leq 30\%$ .

$RSD_R$  : l'écart type relatif, calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de reproductibilité) (SR exprimé en pourcentage de la valeur mesurée).

$RSD_r$  : l'écart type relatif moyen, calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de de répétabilité (Sr exprimé en pourcentage de la valeur mesurée).

La reproductibilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats des mesures d'une même grandeur dans le cas où les mesures individuelles sont effectuées au moyen de différents instruments, suivant diverses méthodes, par des opérateurs distincts en des temps et des lieux différents. La répétabilité concerne la même mesure, effectuée selon la même procédure, avec le même appareillage, par la même personne, en un même lieu et en un temps court vis-à-vis de la durée d'une mesure.

Les limites de détection (LOD) et les limites de quantification (LOQ) ont été déterminées pour chaque toxine en prenant en compte respectivement 3 et 5 fois le bruit de fond. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 23.

Une courbée d'étalonnage est réalisée pour chaque mycotoxine.

*Tableau 23 : Limites de détection et de quantification de chaque mycotoxine*

toxine	Méthodes d'analyse	Limite Détection	Limite quantification
		LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
AFB	solvant acide/ fluorométrie	0,03	0,07
OTA	solvant acide/ fluorométrie	0,02	0,03
ZEA	solvant acide/ fluorométrie	0,10	0,16
FB	Colonne d'immunoaffinité/ fluorométrie	0,5	0,85
CIT	Colonne d'immunoaffinité/ fluorométrie	3	5
DON	Colonne d'immunoaffinité/ Spectre de masse		40

### 3. Utilisation de lignées cellulaires

#### 3.1. Généralités.

Les cultures cellulaires, selon la définition du Comité de terminologie de l'Association américaine de culture de tissu (Schaeffer, 1979), correspondent au maintien en dehors de l'organisme de cellules non organisées en tissu mais capables de se diviser et d'exprimer *in vitro* des métabolismes et des fonctions spécifiques.

Les cultures cellulaires se sont développées pour deux raisons majeures: d'une part car les cultures cellulaires ont atteint un très haut niveau de technicité ; d'autre part pour des raisons éthiques. En effet, les pays industrialisés ont pris conscience que la souffrance des animaux n'est pas indispensable aux progrès de la santé humaine.

L'utilisation des cultures primaires chez l'homme est limitée par les difficultés d'obtention de prélèvements adéquats en particulier chez les sujets normaux. De plus, ce type de culture a une durée de vie limitée même dans des conditions de culture optimales (Gruenert *et al.*, 1990). C'est la raison pour laquelle ont été développées des techniques d'immortalisation cellulaire donnant lieu à des lignées cellulaires.

Sous le nom de lignées cellulaires, on regroupe :

- 1) les lignées dérivées de tissus sains: ce sont des lignées à durée de vie limitée qui correspondent à la culture de cellules normales à caractère diploïde. Ces cellules meurent inéluctablement au bout d'un certain nombre de subcultures; cette mort étant précédée par une période de vieillissement.
- 2) les lignées cellulaires dérivées de tumeurs: ce sont des lignées transformées immortelles qui ont acquis toutes les caractéristiques des cellules tumorales.
- 3) les lignées cellulaires immortalisées grâce à des virus,
- 4) les lignées résultant de transfections de matériel génétique étranger.

Ces deux dernières lignées immortalisées (3 & 4) sont des lignées cellulaires à durée de vie illimitée obtenues par transfection de gènes viraux ou cellulaires immortalisants (Type T de SV40 ou cmv).

#### 3.2 Avantages et inconvénients de leur utilisation.

Les avantages évidents des lignées établies sont la disponibilité d'un matériel expérimental, en principe identique au départ et cela sans procédure d'isolement, la facilité de culture dans des milieux connus, et en ce qui concerne les lignées d'origine humaine, l'absence de restriction éthique pour l'obtention des échantillons.

Elles conservent certaines propriétés spécifiques ; des enzymes y sont inductibles. Certaines fonctions "éteintes" peuvent être restaurées par un choix judicieux du milieu de culture. Elles peuvent aussi être apportées dans le milieu, ou encore transfectées.

Cependant, elles ne sont pas toujours représentatives du tissu d'origine. Elles sont partiellement différenciées. En général, elles sont plus résistantes aux toxiques que les cellules fraîchement isolées. Enfin, les lignées cellulaires sont soumises à des phénomènes de vieillissement et on peut voir leur phénotype évoluer avec le nombre de passage. Ceci entraîne des limites et des précautions d'emploi.

Certains aspects importants sont difficiles à étudier sur les lignées cellulaires. Par exemple, l'étude de la régulation de la réplication cellulaire est délicate sur ces lignées dont la transformation assure une prolifération indéfinie. Par ailleurs, certaines caractéristiques des contacts intercellulaires tels la présence de "tight-junctions" peuvent manquer, limitant les possibilités d'étude de la perméabilité cellulaire. Toutefois, ces lignées sont très utilisées en toxicologie et en particulier dans des études de génotoxicité et de métabolisme.

Les lignées cellulaires constituent donc un outil précieux en biologie cellulaire et toxicologie, sous réserve d'une utilisation réfléchie pour l'étude d'un mécanisme précis.

### 3.3 Description des lignées utilisées.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons utilisé différentes lignées cellulaires pour étudier la génotoxicité et le métabolisme de l'OTA, CIT, FB<sub>1</sub> ainsi que l'effet de la ZEA.

#### 3.3.1 Les cellules rénales d'*opossum* (OK) (ATCC CRL-1840).

La lignée de cellules OK a été établie, par Koyama *et al.* en 1978 à partir d'un rein d'un opossum adulte femelle. Ces cellules sont de type épithélial, non tumorigènes. Les cellules OK maintiennent des fonctions de cellules rénales tubulaires proximales et sont de ce fait un modèle de choix pour l'étude de la néphrotoxicité (Malmstrom *et al.*, 1987) et pour les fonctions de transport (Gstraunthaler, 1988 ; Toutain *et al.*, 1992). Ces cellules ont été employées pour l'étude de l'accumulation de l'OTA et de sa liaison aux protéines (Schwerdt *et al.*, 1996 ; 1999b). Elles possèdent le transport actif du glucose, phosphore et les acides organiques couplés au Na (Gekle *et al.*, 1993; Groves *et al.*, 1998). Elles ont été utilisées pour l'étude des effets toxiques de l'OTA sur le rein (Gekle *et al.*, 1994). Elles ont comme caractéristiques d'être dépourvues d'enzymes de sulfo-conjugaison (Caldwell, 1986).

#### 3.3.2 Les cellules rénales humaines (HK2) (CRL-2190).

La lignée de cellules rénales humaines HK2 a été établie, en 1994 par Ryan *et al.*, à partir d'un cortex de rein sain d'un homme adulte. Ces cellules sont de type épithélial, non tumorigènes, et possèdent les propriétés caractéristiques des cellules tubulaires proximales. Ces cellules ont été immortalisées par transfection des gènes E6/E7 du papilloma virus 16 humain (HPV-16). Elles ont retenu les caractéristiques fonctionnelles de l'épithélium du tubule proximal telles que les systèmes de transport dépendant du sodium.

Les lignées que nous avons utilisées dans notre étude (HK2 et OK) sont un bon modèle d'étude pour les mycotoxines néphrotoxiques (Schwerdt *et al.*, 1999a ; b).

#### 3.3.3 Les cellules mammaires humaines (MCF7) (ATCC HTB-22)

MCF-7 est l'acronyme de Michigan Cancer Foundation - 7, en référence à l'institut de Detroit où la lignée fut établie en 1973, par Herbert Soule et son équipe (Soule *et al.*, 1973).

La lignée MCF7 est issue des glandes mammaires pour tester principalement les effets liés à la zéaralénone. Elles sont cancéreuses non métastatiques. Elles conservent plusieurs caractéristiques de l'épithélium mammaire différencié, y compris la capacité de traiter l'estradiol par l'intermédiaire des récepteurs cytoplasmiques ostrogéniques et la capacité de former des dômes qui contiennent l'oncogène Tx4.

La lignée MCF-7 a été établie en culture *in vitro* à partir d'un épanchement pleural prélevé chez une patiente de 69 ans atteinte d'un cancer du sein métastatique. Ses cellules ont été à l'origine d'une bonne partie des connaissances actuelles sur le cancer du sein (Levenson, 1997).

### 3.4 Produits utilisés en culture cellulaire

Les lignées cellulaires utilisées ont été obtenues chez ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA).

Les milieux de croissance utilisés pour les cultures cellulaires sont les suivants:

- Eagle's minimum essential medium/NUT Mix F-12 (D-MEM contenant 365mg/l de L-glutamine, 3151 mg/l de D glucose, et du pyruvate de sodium) pour la culture des cellules OK,
- le milieu *Eagle's minimum essential medium* (D-MEM avec 1000mg/l de D glucose et supplémenté par 2µM de glutamine) pour les cellules rénales HK2 et MCF7.

Ces milieux ainsi que le tampon phosphate salin (PBS), et la trypsine ont été obtenus chez Invitrogen Life-Technologies (Cergy Pontoise, France). Le tampon PBS est constitué de KCl 0,2 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g/l, NaCl 8 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,15 g/l, pH 7,4. La solution de trypsine est constituée de Trypsine (0,05%)-EDTA (0,53 mM).

Le milieu nutritif est supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) apportant des facteurs mitogènes nécessaires à la division cellulaire et par 1% d'antibiotiques (streptomycine et pénicilline) et 1% L. glutamine, de fournis par Life-Technologies (Cergy Pontoise, France). Le SVF est inactivé pour les HK2 et non inactivé pour les MCF7. Le sérum de veau fœtal (SVF) est inactivé par chauffage sur un bain marie à 56°C pendant 30 min.

Pour les MCF7, 15  $\mu\text{L}$  (1%) d'insuline bovine (facteur de croissance) sont ajoutés dans une flasque contenant 15 mL de milieu

Les consommables proviennent du laboratoire Becton Dickinson. Le diméthyl sulfoxyde (DMSO) provient de chez Sigma (France).

### 3.5 Conditions de culture

#### 3.5.1 Maintien des constantes physico-chimiques

Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75  $\text{cm}^2$ , contenant 10 ml de milieu de culture supplémenté en sérum de veau foetal (SVF) et antibiotiques, à 37 °C dans une atmosphère humide et saturée à 5%  $\text{CO}_2$  dans une étuve stérile. Le système tampon utilisé est le bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) en équilibre avec le  $\text{CO}_2$  de l'étuve, permettant de maintenir un pH de 7,4.

#### 3.5.2 Mise en culture d'une lignée cellulaire

Les souches cellulaires sont conservées dans de l'azote liquide dans 1 ml d'une solution de congélation (1 ml de milieu de culture contenant 10 % de DMSO, 40 % de sérum de veau fœtal).

Sorti de l'azote liquide, le tube reste 1 min à température ambiante avant d'être porté à 37 °C, 1 min dans un bain-marie. Dix ml de milieu de culture supplémenté (10 % de sérum de veau fœtal, 1% de pénicilline/streptomycine), préalablement chauffé à 37°C, sont versés dans une flasque de 75  $\text{cm}^2$  avec 1 ml de la culture de cellule décongelée. Une nuit à 37°C permet l'adhésion des cellules au support. Au bout de trois jours, les cellules ne pouvant plus se développer correctement due à l'épuisement du milieu de culture, il est nécessaire d'effectuer un passage ou repiquage pour maintenir la viabilité des cellules et l'état de culture. Cette opération permet l'amplification de la culture cellulaire (figure 59).

#### 3.5.3 Amplification d'une lignée cellulaire

Cette étape consiste à réduire le nombre de cellules contenues dans les boites, afin de leur permettre de poursuivre leur développement correctement. Pour les cellules HK2, le repiquage est effectué à 80% de confluence. Le milieu de culture est aspiré et la flasque est rincée à deux reprises avec du PBS. Ceci a pour but d'éliminer les traces de SVF, inhibiteur de la trypsine. Trois ml de trypsine (1X) pour les cellules HK-2 et trois ml de trypsine dilué de moitié pour les cellules MCF7, préalablement chauffée à 37°C, est ajouté dans chaque flasque afin de décoller le tapis cellulaire. La flasque est placée à 37°C pour favoriser l'activité enzymatique de la trypsine. Quand la dissociation du tapis cellulaire est visible à l'oeil nu, la trypsination est stoppée par addition dans la flasque de 5ml de milieu de culture complet. Le surnageant, contenant les cellules, est récupéré et centrifugé 10 minutes, à 2000rpm (Sigma 3k10) à 4 °C. Les cellules culottées sont remises en suspension dans la quantité de milieu nécessaire à l'obtention d'une solution de  $10^6$  cellules/ml environ. La suspension cellulaire obtenue est répartie dans différents flacons, à raison de 1ml par boite, auxquels sont ajoutés 14 millilitres de milieu de culture (figure 59).

### 3.5.4 Mise en conservation d'une culture cellulaire

Les cellules à confluence d'une flasque sont décollées par trypsination (addition de 3 ml de trypsine (1X) pour les cellules HK-2 et de 3 ml de trypsine (dilué de moitié) pour les cellules MCF7); elles sont culottées par centrifugation 10 minutes, à 4°C, 2400 rpm (Sigma 3k10), puis le culot est remis en suspension dans 1 ml de milieu de congélation.

Le milieu de congélation est composé comme suit : il s'agit de milieu de culture, sans antibiotiques, supplémenté avec 10% DMSO et 40% SVF pour les cellules HK-2 et MCF7.

Le ml de milieu de congélation, contenant les cellules, est disposé dans des tubes cryogéniques NALGENE, et est placé une nuit à -80°C dans une boîte de cryocongélation puis est mis dans l'azote liquide.

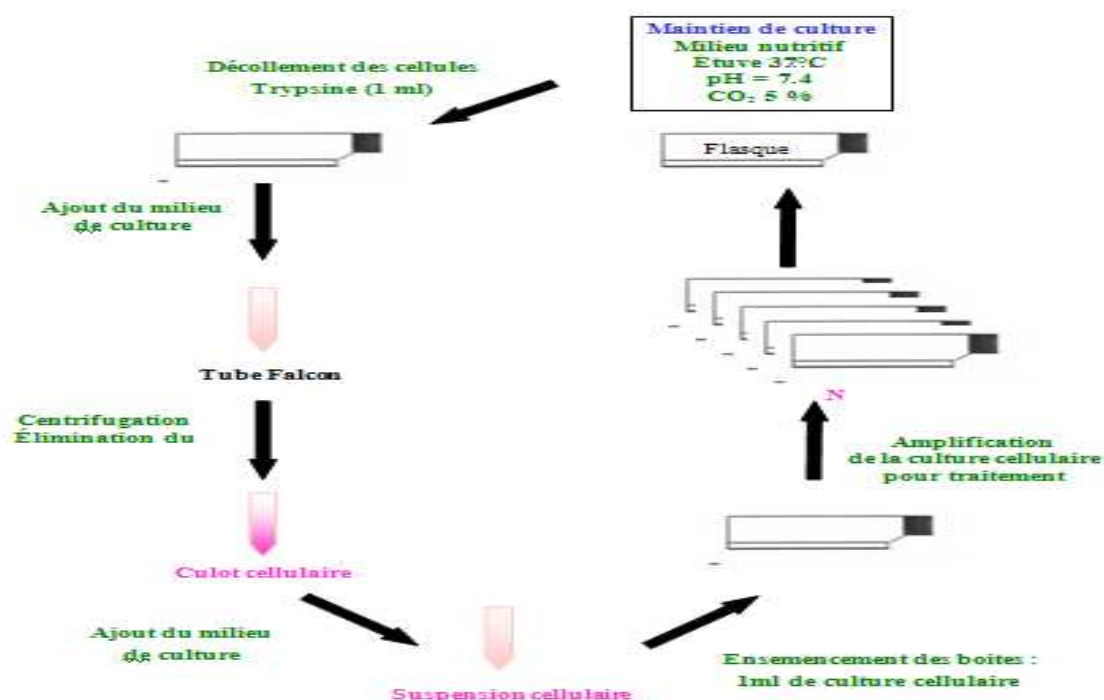


Figure 59 : Schéma de la culture des cellules.

### 3.6 Conditions de traitement des cellules pour la détection des adduits

Quel que soit le type cellulaire, les traitements ont été effectués avec un milieu supplémenté avec 5 % de sérum de veau fœtal et 1 % de pénicilline/streptomycine.

Il est nécessaire de réaliser au préalable une amplification des cellules afin de disposer d'un nombre suffisant de flasques pour les traitements.

Les cellules sont traitées par des solutions de toxines diluées dans du milieu de culture stérile non supplémenté en SVF.

Chaque traitement est réalisé en triplicata ainsi qu'un témoin négatif correspondant à des cellules n'ayant pas reçu de toxine. Pour chacune des flasques, le milieu de culture est aspiré et un lavage au PBS durant une minute est effectué. On rajoute ensuite 9 ml de milieu de culture puis 1ml des solutions de mycotoxines sont directement introduites dans la flasque. L'incubation est réalisée à l'étuve à 37°C selon un temps prédéfini (2h, 7h, 24h).



## 4. Test de viabilité cellulaire

### 4.1 Produits utilisés pour le test de viabilité cellulaire

Le test de prolifération a été réalisé sur des plaques de 96 puits de chez Falcon et fournis par Becton Dickinson (Le pont de Claix, Allemagne). Les réactifs viennent du kit : « cell titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay » (Ref : G3580) non radioactive acheté chez Promega (Allemagne) contenant la solution « MTS ou MTT ».

### 4.2 Principe du test de viabilité cellulaire

Le test au MTT (Mosmann, 1983) est utilisé pour évaluer le nombre de cellules viables. L'essai MTT est un test colorimétrique de prolifération cellulaire fondé sur l'activité métabolique des cellules viables. Il mesure l'activité des enzymes qui réduisent le MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide), un tétrazole de couleur jaune en un composé violet, le formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Ce test est donc essentiellement une mesure de l'activité mitochondriale. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés (dans le DMSO) et sont ainsi détectables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm. Ce test est utilisé pour comparer la croissance des cellules contrôles à celles des cellules traitées par les molécules.

Les réactions de réduction des sels de tétrazolium en formazan ne se produisent que si les réductases mitochondriales sont actives. L'absorbance mesurée est donc directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Le test au MTT en révélant un ralentissement de l'activité métabolique des cellules rend compte des événements apoptotiques et nécrotiques intervenants dans la cellule.

L'essai MTS est une alternative récente au test MTT. En présence de phénazine méthosulfate (PMS), le MTS, 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4 sulfophényl) 2H-tétrazolium, forme un dérivé soluble du formazan (figure 60). Cet essai possède deux avantages par rapport au test MTT :

- Le mélange MTS+PMS est plus réactif que le MTT ;
- Le produit formé est soluble dans l'eau.

Ce nouvel essai est donc théoriquement plus sensible que le test MTT.

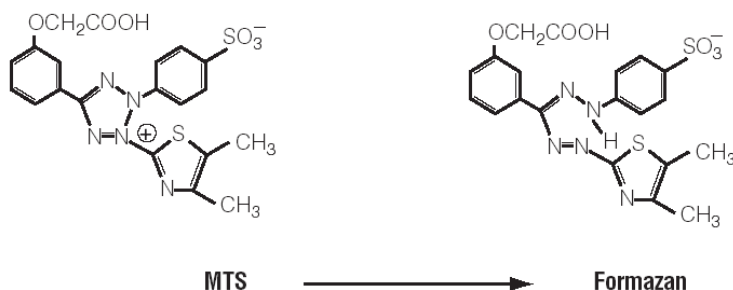


Figure 60 : Structure du MTS tétrazolium et son produit le formazan

Après détachement du tapis cellulaire collé au fond de la boîte par trypsination (2 min à 37°C), la suspension cellulaire est centrifugée à 2000rpm (Sigma 3k10), pendant 10 min et 4°C. Après avoir éliminé le surnageant, le culot cellulaire est repris dans 4 ml de milieu milieu à 5% SVF (inactivé pour les HK2 et non inactivé pour les MCF7) pour effectuer le comptage des cellules. Les cellules contenues dans une goutte de cette solution homogène sont comptées sur « cellule de Mallassez ». Chaque puits de la plaque de 96 puits estensemencé avec 5555 cellules. Après une nuit d'adhésion des cellules sur le support à 37 °C, 10 µl des concentrations de toxines à tester, sont ajoutés, en triplicata, dans les puits pendant 24 h à 37 °C. De même, un témoin sans traitement est réalisé par l'ajout de 10 µl de milieu.

Pour les MCF7, le milieu est changé au bout de 24h avant l'ajout des traitements. Les puits sont vidés en tapotant sur du papier ou de la gaze stérile, et le milieu est remplacé par un nouveau milieu. Il s'agit d'ajouter dans chaque puits 90µl de milieu DMEM incomplet (sans SVF) au quel on ajoute 5% de milieu CS (traité sur charbon actif). Le SVF non traité peut contenir des hormones bovines qui

pourraient influencer la croissance des cellules et biaiserait le test. Les cellules traitées sont alors incubées pendant 24h et 48h à 37 °C.

A la fin de l'incubation (24h et 48h), 20 µl de solution de « MTS » sont ajoutés. Après 3h d'incubation à 37 °C, l'absorbance de chaque puits est mesurée grâce à un lecteur de plaques 96 puits à 490 nm. Le principe du test est schématisé dans la figure 61.

Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle :

$$(\text{DO moyenne des cellules traitées} / \text{DO moyenne des cellules contrôles}) \times 100 \pm \text{écart-type}$$

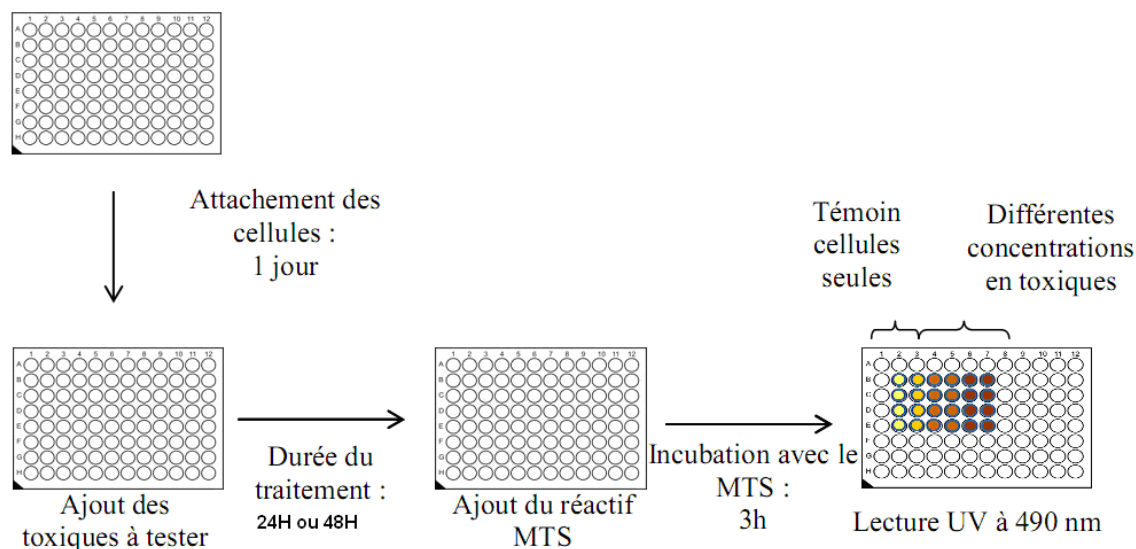


Figure 61 : Test de cytotoxicité cellulaire

## 5. Test de génotoxicité

Sous l'influence de certaines substances dites génotoxiques, la structure du génome est modifiée par l'action sur les molécules d'ADN : des mutations, des adduits peuvent survenir et aboutissent parfois à l'enclenchement d'un processus cancéreux.

### 5.1 Extraction de l'ADN selon matrice

Cette première étape consiste à casser les membranes du tissu afin de libérer l'ADN des noyaux. L'extraction se fait à froid dans de la glace pour limiter l'activité des DNases cellulaires et ainsi préserver l'intégrité de l'ADN.

#### 5.1.1 A partir de tissus

Environ un demi-gramme d'organe est écrasé dans 400µl de SET\* à l'aide d'un homogénéisateur. Le récipient est rincé avec du SET. On ajoute à cet homogénat 200µL de SDS à 10%. Le mélange est porté dix minutes à 65°C puis placé dans la glace pendant trente minutes.

Les cellules en suspension, ou le broyat d'organe sont centrifugés pendant 25 minutes à 13 000 rpm à 15°C dans une centrifugeuse Sigma1K-15. Le surnageant contenant l'ADN et l'ARN est récupéré dans un tube de 15 ml. On ajoute 2 volumes d'éthanol (≈ 4 ml) pur, froid (-20°C) et on agite vivement : les pelotes d'ADN apparaissent. Les tubes sont placés une nuit au -20°C. Les filaments d'ADN sont récupérés à la pipette ou par centrifugation 1,5 ml par 1,5 ml dans un tube conique de 2ml. Les pelotes sont centrifugées 25 minutes, à 13 000 rpm (Sigma 1K15), à 0°C. Le surnageant est délicatement éliminé pour ne pas perdre le culot d'ADN. L'ADN est lavé avec 1 ml d'éthanol à 90 %, froid puis centrifugé 15 minutes, à 13000 rpm, à 0°C dans une centrifugeuse Sigma

1K-15. Le surnageant est éliminé, et les acides nucléiques sont dissous dans 500µl de SET<sup>3</sup>. Pour faciliter la dissolution, une incubation à 37°C pendant 15 minutes est réalisée.

### 5.1.2 A partir du sang

Un ml de sang est agité en présence d'un gramme de billes en verre et 2 ml de SET pendant 1 minute. Le mélange est centrifugé 5 minutes à 13000rpm (Sigma 1K15), à 0°C, afin de pouvoir enlever les billes. Le mélange est incubé dix minutes à 65°C en présence de 300µL de SDS à 20%. Puis, les protéines sont précipitées par ajout de 2400 µl d'Acétate de potassium (6 M, pH 5) pendant 30 min dans la glace. L'échantillon est ensuite centrifugé à 0 °C, 25 min à 13000 rpm (Sigma 1K15). Les acides nucléiques sont récupérés et lavés comme indiqué au paragraphe précédent.

### 5.1.3 A partir des cellules

Trois boîtes de cellules, correspondant au même type de traitement, sont plongées dans un bac de glace pour figer l'état cellulaire et éviter la dégradation de l'ADN. Le tapis cellulaire est gratté deux fois avec des grattoirs dans 4 ml de SET. Les fractions contenant les cellules des trois boîtes sont récoltées dans un tube de 50 ml. Elles sont centrifugées 10 min à 4°C à 2400 rpm (Sigma 3k10). Le surnageant est mis de côté et conservé à -20°C. Le culot est lavé avec 4 ml de SET dans les mêmes conditions que précédemment décrites pendant 10 min. Le culot cellulaire est ensuite remis en suspension dans 800 µl de SET à 4°C et transvasé dans un micro-tube de 2 ml.

Cent µl de SDS à 20 % sont ajoutés à l'échantillon et incubés pendant 10 min à 65 °C pour casser les membranes. Puis, les protéines sont précipitées par ajout de 800 µl d'Acétate de potassium (6 M, pH 5) pendant 30 min dans la glace. L'échantillon est ensuite centrifugé à 0 °C, 25 min à 13000 rpm (Sigma 1K15). Les acides nucléiques sont récupérés comme décrit dans les paragraphes précédents.

## 5.2 Purification et dosage de l'ADN

L'ARN est éliminé par l'action de Rnases. Dans un premier temps, le mélange de Rnase A à 20mg/ml, et de RNase T1 à 10000 UI/ml est dissous dans de l'eau ultrapure. Le mélange est mis à bouillir à 100°C pendant 15 minutes pour détruire les Dnases. Dix µl de ce mélange sont ajoutés à l'échantillon d'ADN à purifier. Au bout d'une heure d'incubation à 37°C, on rajoute 10µl du mélange de Rnases. L'ensemble est incubé une heure supplémentaire à 37°C. Pour détruire les protéines, 25 µl de Protéinase K à 20 mg/ml dissous dans du SET sont ajoutés au mélange qui est incubé une heure à 37°C.

La purification de l'ADN se poursuit par ajout de 500µl (1 Volume) de Rotiphénol® (Roth Sichel : phénol saturé en tris pH 8). Le mélange est agité mécaniquement pendant 20 min. Le mélange est centrifugé à 13000rpm pendant 15 min à 15°C (Sigma 1K15). Le surnageant est récupéré dans des microtubes. On renouvelle l'extraction comme précédemment, lors d'une extraction de l'ADN à partir des organes. Cinq cent µl de SEVAG (24v Chloroforme/1v Alcool isoamylique) sont ajoutés au surnageant. On agite 20 Secondes puis on centrifuge 5 minutes à 13000rpm (Sigma 1K15). Le surnageant, qui doit être limpide, est récupéré.

Deux volumes d'éthanol froid pur (-20°C) et 50µl d'acétate de sodium 3M sont ajoutés. Les pelotes apparaissent immédiatement. Laisser 1 nuit au -20°C. L'ADN est récupéré comme précédemment.

<sup>3</sup>

\* Pour 250 ml de SET mélanger : 5 ml de NaCl de 5M, 12.5 ml EDTA 0.4M, 6.25 ml TRIS 2M. Ajuster le pH à 8 avec NaOH 5M Compléter avec de l'eau miliQ qsp 250 ml volume final.

### 5.3 Estimation de la qualité et de la quantité d'ADN

Les solutions d'ADN sont mises 15 minutes au bain marie 37°C avant lecture au spectrophotomètre (Secomam, Anthelie advanced 5) afin d'avoir une solution homogène.

L'intégralité de l'échantillon est transférée dans des cuves en quartz de 1 ml de contenance. La pureté et la quantité d'ADN en solution sont évaluées en faisant un spectre entre 220 et 320 nm. Le maximum d'absorption de la molécule d'ADN se situe entre 258 et 260 nm.

Un déplacement du maxima d'absorption vers 250 nm ou 280 nm indique une contamination de l'ADN par de l'ARN, ou par des protéines respectivement (figure 62). Par conséquent sa purification doit être refaite à partir de cette solution.

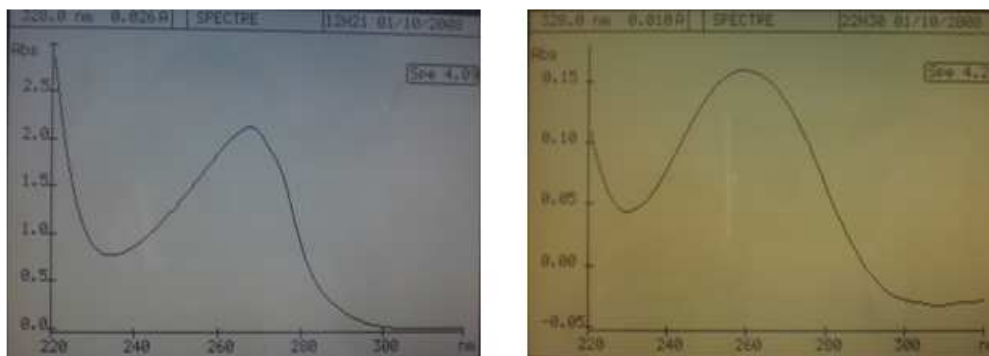


Figure 62 : Spectre d'ADN non pur contaminé en protéines (photo de gauche) et ADN pur (photo de droite)

La quantité d'ADN de l'échantillon est calculée en considérant que 1 unité d'absorbance équivaut à 50 µg/ml. Des aliquotes contenant 4 µg d'ADN sont préparés à partir de la solution mère d'ADN et sont ensuite séchés à l'aide d'une centrifugeuse à évaporation sous vide (« Speedvac concentrator » de Savant). A partir de cette étape, l'aliquote d'ADN est prêt à être hydrolysé en vue du marquage.

### 5.4 Analyse des adduits à l'ADN par la méthode du post-marquage au phosphore 32

#### 5.4.1 Produits utilisés pour le post-marquage

##### 5.4.1.1 Les produits chimiques

Les produits chimiques utilisés sont dits de qualité « pour analyse ». Le Phosphate de Sodium Dihydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), l'Urée, l'Hydroxyde de Lithium ( $\text{LiOH}$ ), la soude, l'acide chlorhydrique, l'acide formique, l'acétate de potassium, le SDS (sodium dodécyl sulfate), l'isopropanol et l'éthanol proviennent de VWR International (Fontenay sous bois, France). La bicine, le chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ), le dithiothréitol (DTT), la spermidine, le chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ), l'EDTA, le Tris, le Trizma base, le triton X-100, le sucrose proviennent de Sigma (St Quentin Fallavier, France).

Le  $\gamma$   $^{32}\text{P}$ -ATP (6000 Ci/mmmole, 10 µCi/µl) provient d'Amersham Biosciences (Orsay, France). Le Roti-phénol (phénol saturé en Tris-HCl) provient de Roth-Sochiel (Lauterbourg, France). La poudre de cellulose « MN 301 » vient de chez Macherey Nagel (Düren, Allemagne). La polyéthylèneimine (HCl à 5%) Corcat PEI P 600xE est fournie par CORCAT (Virginia Chemicals, Portsmouth, VA, USA).

##### 5.4.1.2 Les enzymes

La phosphodiesterase bovine de rate (SPD) (P 9041), la nucléase de staphylocoque (MN) (N 3755), la protéinase K (P 6556), la ribonucléase T1 (RNase T1) d'*Aspergillus* (R 1003) et la Ribonucléase pancréatique de bœuf (RNase A) (R 4875) sont fournies par Sigma chimie (St Quentin Fallavier, France). La nucléase P1 (236 225) (*Penicillium citrinum*) et la T4 polynucléotide kinase (R838 292) proviennent de Roche Diagnostic (Meylan, France).

#### 5.4.1.3 Matériels de chromatographie

Les plaques de polyéthylène-imine-cellulose (PEI) sont préparées au laboratoire. Le support en plastique 130 cm × 20 cm provient de chez France Plastics (Lyon, France). Soixante-treize grammes de cellulose sont mélangés à 48 ml d'une solution de polyéthylène-imine-HCl à 5 % et 500 ml d'eau distillée. L'étaleur (Desaga Heidelberg, Allemagne) sert à couler le mélange, après dégazage sous vide, sur les supports plastiques. Les plaques sèchent à température ambiante pendant environ 16 heures. Elles sont ensuite découpées au format 18cm × 26 cm, lavées au méthanol (1 minute) et rincées dans deux bains d'eau distillée puis séchées à température ambiante. Les plaques sont découpées aux dimensions 18 cm × 13 cm et sont stockées à -20 °C jusqu'à utilisation.

Le papier Whatman n°1 provient de Whatman international Ltd (Maidstone, England). Pour les autoradiographies, on utilise des films de radiographie Kodak de 20cm × 40 cm et de 30 cm × 40 cm, le révélateur Kodak LX24 et le fixateur Kodak AL4 à 20 % (Coradio, France). Les microtubes (1,5 et 2 ml) proviennent d'Eppendorf (Hamburg, Allemagne). Ils sont lavés au méthanol puis rincés deux fois à l'eau distillée avant utilisation.

#### 5.4.1.4 Les adduits standard

Un contrôle négatif est réalisé lors de chaque post-marquage, il consiste à analyser un ADN dépourvu d'adduits. Nous utilisons pour cela une solution d'ADN de sperme de saumon préalablement purifié. 2µL de cette solution, correspondant à 7µg d'ADN, sont marqués lors de chaque analyse.

L'adduit standard d'OTA : C-C8 OTA-3'dGMP a été synthétisé par l'équipe de R. Manderville (université de Guelph, Ontario, Canada). Le standard C-C8 OTA est marqué radioactivement dans les mêmes conditions que nos échantillons. La comparaison des coordonnées de migration de ces adduits standard avec celles des adduits détectés sur les plaques de chromatographie, permet d'identifier la présence éventuelle d'adduits dans les échantillons d'ADN cellulaire ou d'humain. Cela nous sert aussi à quantifier les adduits.

Le calcul de leur concentration est présenté ci-dessous :

Nous disposons de 10µg de chaque produit correspondant à la molécule d'OTA fixée d'une manière covalente sur la guanine. Soit un poids moléculaire pour le C-C8 OTA-3'dGMP de 714g/mol. Ce qui veut dire que l'on a 10µmole/714 soit 0,0140µmole d'adduit C-C8 OTA-3'dGMP.

Puisque 1 mole de nucléotide pèse environ 330g, 1g d'ADN correspond à 1/330 moles de nucléotides d'où 1µg équivaut à  $3,03 \cdot 10^{-9}$  nucléotides. On sait que 1 adduit /  $10^9$  nucléotides normaux c'est aussi 1/0,33 femtomole/mg d'ADN, ce qui signifie que 1 adduit /  $10^9$  nucléotides normaux correspond à 3,03 femtomole d'adduit/mg d'ADN. Ainsi pour détecter 100 adduits/ $10^9$  nucléotides normaux, il faut avoir 303 femtomoles/mg d'ADN. Soit lors de l'analyse de 7µg d'ADN, la présence de 2,12 femtomoles d'adduits.

- Les 10µg de chaque standard sont dissous dans 100µl d'eau ultra-pure. Ce qui donne les concentrations de solutions mères suivantes :

C-C8 OTA-3'dGMP =>  $140 \text{ picomoles}/\mu\text{l} = 140 \cdot 10^3 \text{ femtomoles}/\mu\text{l}$  soit  $66037 \cdot 10^{-6}$  adduits/µl

Les solutions mères de standard sont conservées à -80°C.

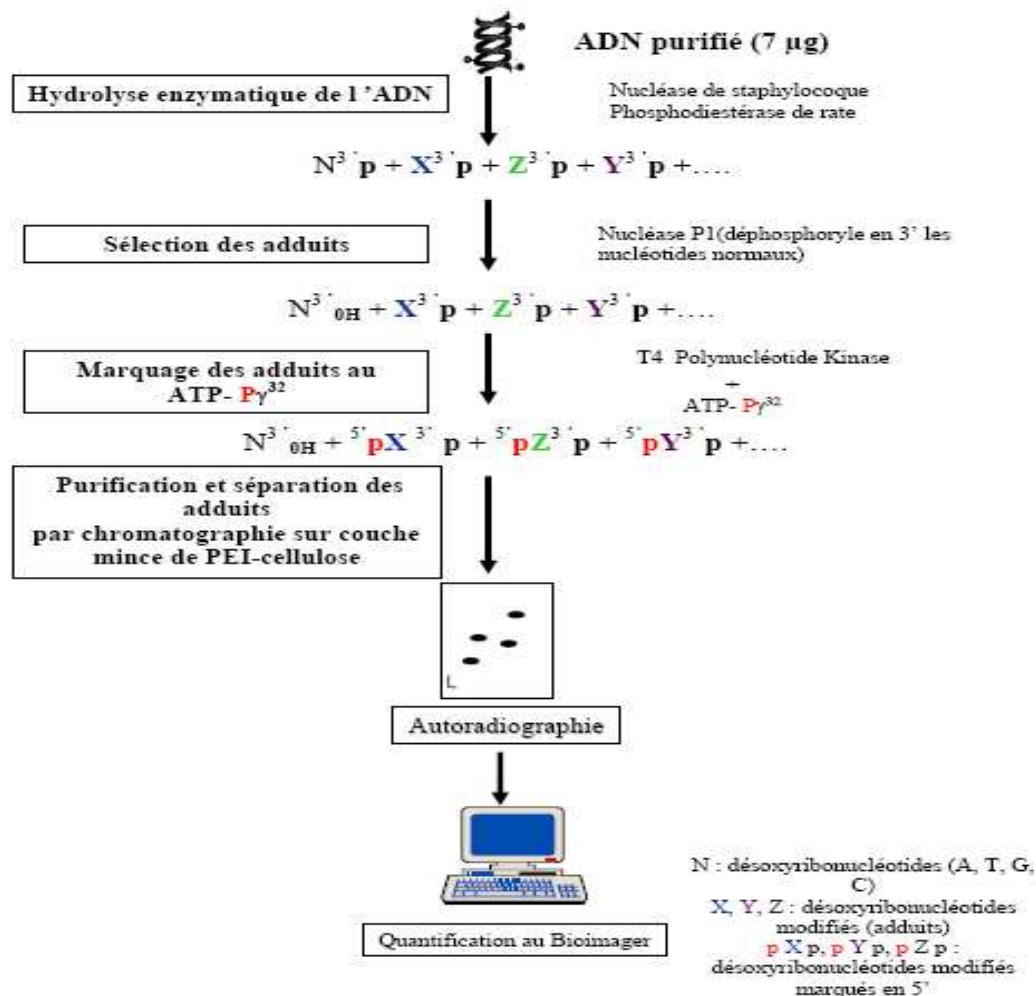
#### 5.4.2 *Principe du post-marquage*

La détection directe des adduits à l'ADN par la méthode du post-marquage au phosphore 32 est une méthode fine et extrêmement sensible (1 adduit /  $10^{10}$  nucléotides), qui permet de mettre en évidence le caractère génotoxique d'une substance.

Au laboratoire, nous utilisons une version modifiée de la méthode initiale (Randerhat *et al.*, 1981) qui permet d'atteindre une sensibilité de 1 adduit par  $10^{10}$  nucléotides (Reddy & Randerhat, 1986). Elle comporte les étapes suivantes (figure 63):

- Après extraction et purification de l'ADN, celui-ci est hydrolysé en désoxyribonucléosides 3' -monophosphate par deux enzymes, une endonucléase (nucléase de Staphylocoque) et une exonucléase (Phosphodiesterase de rate). A cette étape le milieu réactionnel contient un mélange de nucléotides normaux et modifiés (les adduits).

- On procède alors à une étape d'enrichissement en adduits qui consiste, par l'activité 3'phosphatasique de la nucléase P1, à couper le phosphate en 3' des nucléotides normaux. Il s'agit d'une déphosphorylation sélective des désoxyribonucléotides normaux. La configuration structurale de l'adduit protège la liaison du phosphate en 3' et celui-ci sera donc conservé dans les adduits après cette étape.
- On réalise alors un marquage enzymatique spécifique des adduits. Seuls les 3'P-nucléotides sont substrats de la polynucléotide kinase T4, qui a pour propriété de transférer un phosphate radioactif en position  $\gamma$  de l'ATP sur la position 5' du nucléotide. Ainsi, seuls les adduits sont marqués, les nucléosides normaux ne pouvant pas être phosphorylés, ils n'interfèrent donc pas dans le marquage.
- Les nucléosides normaux et l'excès de phosphate inorganique sont séparés du ou des différents adduits par migration sur plaque de couche mince de polyéthylène-imine cellulose dans des solvants aqueux de forte salinité. Ceux-ci permettent la migration des substances hydrophiles, alors que les adduits qui sont hydrophobes restent au point d'origine, ou migrent légèrement suivant leur degré d'hydrophobicité.
- Les adduits sont alors séparés par chromatographie bidimensionnelle échangeuse d'anions, sur plaque de couche mince de polyéthylène-imine cellulose.
- Les adduits et leur emplacement sont visualisés par autoradiographie des plaques. Les autoradiogrammes obtenus deviennent le support du travail de l'analyse qualitative et quantitative. La radioactivité des plaques est scannée par un appareillage spécial (Bioimager) qui permet d'effectuer la quantification des spots radioactifs correspondant aux adduits de l'autoradiogramme grâce au logiciel *Ambis* (CSP incorporation, Billerica, USA).

Figure 63 : Principe de la méthode du post-marquage au  $^{32}P$

### 5.4.3 Marquage des adduits

#### 5.4.3.1 Hydrolyse de l'ADN

Les 4 µg d'ADN séchés sont hydrolysés en nucléosides-3'-monophosphates par les actions combinées de la phosphodiesterase de rate et de la nucléase de staphylocoque pendant 4 heures à 37°C dans 10 µl de mélange réactionnel suivant :

- 0,47 µl de phosphodiesterase de rate (2 mg/ml)
- 1 µl de nucléase de Staphylocoque (3,2 mU/µg d'ADN)
- 2 µl de tampon succinate (200 mM)/CaCl<sub>2</sub> (100 mM), pH 6
- 6,53 µl H<sub>2</sub>O ultra pure.

#### 5.4.3.2 Enrichissement à la nucléase P1

L'ADN hydrolysé est incubé 45 min à 37 °C après avoir rajouté 5 µl du milieu réactionnel suivant :

- 1,5 µl de nucléase P1 (4 mg/ml)
- 1,6 µl de ZnCl<sub>2</sub> (1 mM)
- 1,6 µl Acétate de Na (0,5 M, pH 5)
- 0,3 µl H<sub>2</sub>O ultra pure

La réaction est stoppée par l'ajout de 3 µl de Tris base (500 mM).

#### 5.4.3.3 Marquage des adduits au <sup>32</sup>P en position 5'

Après enrichissement à la nucléase P1, les échantillons sont incubés 45 min en « salle chaude » (salle radioactive) à 37 °C en ajoutant 5 µl de mélange réactionnel suivant :

- 100 µCi de <sup>32</sup>P-ATP préalablement séché
- 2 µl de tampon bicine \*
- 0,32 µl de polynucléotides kinase T4 (10 UI/µl)
- 2,68 µl d'H<sub>2</sub>O ultra pure

\* le tampon bicine est constitué de : 500 µl de bicine 800 µM, 500 µl de dithiothréitol (DTT) 400 mM, 500 µl de MgCl<sub>2</sub> 400 mM, 55 µl de spermidine 400 mM, 445 µl d'eau distillée ajusté à pH 9,8 avec de la soude.

Suite à des changements de produits par les fournisseurs et afin vérifier la validité de l'expérience, des tests d'efficacité de l'hydrolyse et de l'enrichissement par la nucléase P1 sont réalisés.

#### 5.4.3.4 Test d'efficacité de l'hydrolyse : marquage des nucléotides normaux

2µl de la solution d'ADN hydrolysée sont prélevés et dilués (x 1200) dans de l'eau ultra-pure. Un volume de 5µl de cette solution est prélevé et incubé en salle chaude 1h à 37°C en présence de 8µl d'eau ultra pure et de 5µl du mélange réactionnel suivant :

- 100 µCi d' <sup>32</sup> P-ATP préalablement séché
- 2 µl de tampon bicine \*
- 0,32 µl de polynucléotides kinase T4 (10 UI/µl)
- 2,68 µl d'H<sub>2</sub>O ultra pure

Après une heure d'incubation, le volume réactionnel est complété jusqu'à 300µl par de l'eau ultra pure soit 282µl, puis 3µl sont prélevés et déposés sur une plaque de PEI-cellulose de 18cm de long. Celle-ci est mise à migrer 1h30 dans du tampon à 250 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 40 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. La plaque est ensuite séchée, exposée 40 min à température ambiante puis autoradiographiée (figure 64).



#### 5.4.3.5 Test d'efficacité de l'enrichissement par la nucléase P1

Les gouttes résiduelles restantes dans le tube de marquage après dépôt sur la plaque sont diluées dans 50  $\mu$ L d'eau ultra-pure. Cinq  $\mu$ L de ce mélange est prélevé et déposé sur une plaque de PEI-cellulose de 18cm de long. Celle-ci est mise à migrer 1h30 dans du tampon à 250 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et 40 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . La plaque est ensuite séchée, exposée 40 min à température ambiante puis autoradiographiée.

Ce test permet de savoir si l'hydrolysât d'ADN a bien été enrichi en adduits par le traitement avec la nucléase P1 qui catalyse la déphosphorylation en 3' des nucléotides normaux. Ceux-ci ne sont plus des substrats de la polynucléotide kinase et ne doivent donc pas être marqués au  $^{32}\text{P}$  pendant le marquage des adduits à l'ADN. Sur le film d'autoradiographie, les bases de l'ADN ne doivent être que d'une très faible intensité (figure 64).

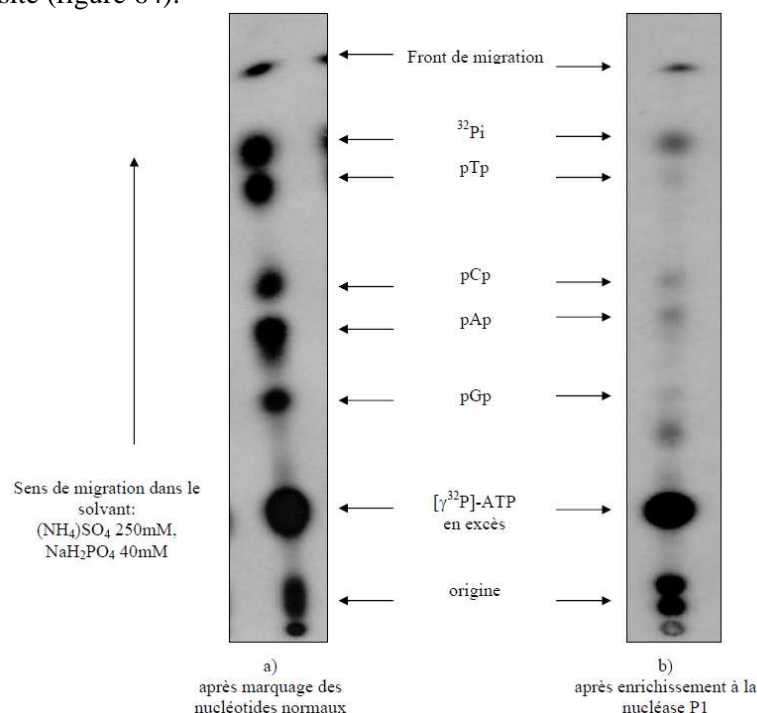


Figure 64 : Schéma de migration des nucléotides normaux : a) autoradiographie après marquage des nucléotides normaux, b) autoradiographie après "enrichissement" à la nucléase P1.

#### 5.4.3.6 Séparation des adduits par chromatographies bidimensionnelles sur couche mince de polyéthylène-imine-cellulose

Plusieurs chromatographies (figure 65) sur des plaques de PEI cellulose sont nécessaires afin de séparer les adduits selon leurs propriétés chromatographiques selon l'ordre suivant :

##### A) Dépôt des échantillons et purification des adduits (Dimension 1)

A l'extrémité de chacune des plaques de cellulose de 18 cm  $\times$  13 cm, est agrafé un papier Whatman n°1 de 20 cm de longueur. Chaque plaque est prévue pour recevoir six dépôts d'échantillons. Les dépôts sont espacés entre eux de 2 cm. La migration dure 16 heures dans du phosphate monosodique (3 M ; pH 5,7) pour la séparation des adduits d'OTA. Ce solvant ne permet pas la migration des adduits, qui étant hydrophobes, restent au point de dépôt. Par contre, l'excès d'ATP et les nucléotides normaux sont éliminés. Une fois la migration terminée, la bande de papier est jetée et la plaque est lavée deux fois 5 min dans de l'eau distillée sous agitation.

Une autoradiographie des plaques (20 minutes en salle obscure, révélation, rinçage à l'eau distillée, fixation et rinçage à l'eau distillée) permet de vérifier la pureté de l'échantillon.



**B) Transfert et migration bidimensionnelle pour la séparation des adduits****Migration Dimension 2**

Cette étape permet de transférer le dépôt sur une plaque de cellulose de 18cm × 13 cm et de faire migrer les adduits dans le sens vertical de la plaque. Les points de dépôt sont découpés de la plaque de D1 et le transfert sur la plaque D2 se fait par contact 'cellulose à cellulose', les deux parties de cellulose sont maintenues par des aimants. La migration est amorcée dans de l'eau distillée et les plaques sont ensuite placées dans des cuves avec 70 ml de solvant (Urée 7,7M, formate de Li 4,8M, pH = 3,5). La migration dure environ 4 heures à 25 °C. Les plaques sont ensuite lavées deux fois à l'eau distillée pendant 5 minutes puis séchées. Les plaques sont découpées à la dimension 16 × 13 cm.

**Migration Dimension 3**

La migration D3 s'effectue dans le sens perpendiculaire à la migration D2 (1/4 dans les sens inverse des aiguilles d'une montre) et permet de déplacer les adduits dans le sens de la largeur de la plaque. Une bande de papier Whatman (16 cm × 2,5 cm) est agrafée dans le sens de la longueur de la plaque sur le bord de la plaque. La migration est amorcée dans un solvant D3' (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,7M). Les plaques sont placées dans des cuves contenant 70 ml de solvant de migration (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6M, Urée 7M, pH 6,4) à 25°C. La migration dure 3h. Après avoir éliminé le papier Whatman, les plaques sont lavées deux fois à l'eau distillée pendant 5 minutes puis séchées.

**Migration D4**

La migration D4 est dans le même sens que la migration précédente. Il s'agit essentiellement d'un lavage permettant d'éliminer la radioactivité non spécifique et donc de réduire le bruit de fond. Une bande de papier Whatman (16 cm × 4 cm) est agrafée dans le sens de la largeur de la plaque. La migration dure une nuit dans 70 ml de phosphate monosodique (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 M, pH= 6) à 25°C. Après avoir enlevé le papier Whatman, les plaques sont lavées deux fois 5 minutes à l'eau distillée puis séchées et découpées au format 9,5 cm × 14,5 cm à partir de l'origine du dépôt.

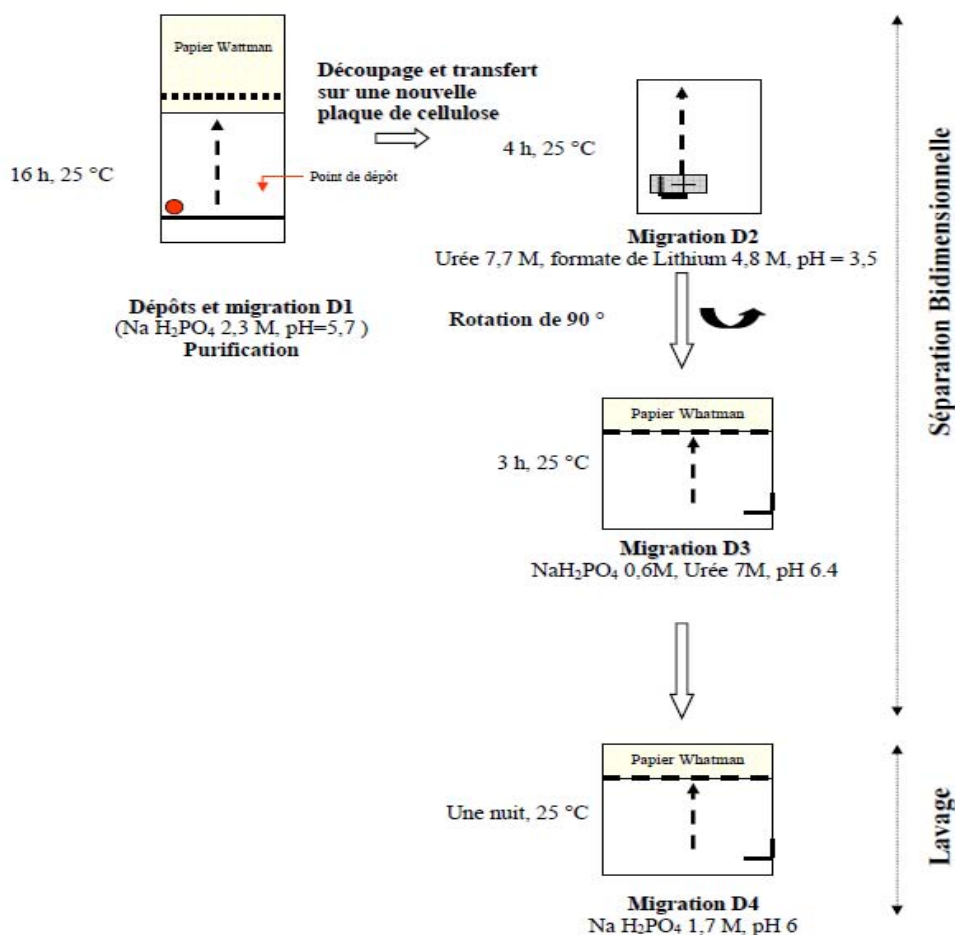


Figure 65 : Chromatographies successives pour la purification et la séparation des adduits sur des plaques de PEI-cellulose.

#### 5.4.4 Autoradiographie et quantification des adduits

Les plaques sont mises à autoradiographier sur des films ultra-sensibles (KODAK (20 cm/40 cm) sur lesquels on pose un écran amplificateur, le tout est placé 48 h à -80°C. Les films sont ensuite placés dans un bain de révélateur (Kodak LX24) (20 %) jusqu'à apparition des spots d'adduits (1 minute environ), puis rincés à l'eau distillée et fixés pendant 1 minute dans un bain de fixateur (Kodak AL4) (20 %) puis rincés successivement dans deux bains d'eau distillée. Après séchage, les films sont ensuite numérisés.

Pour la quantification des adduits, les plaques de cellulose sont scannées par un bio-imager et les scans sont traités par le logiciel « Ambis ». Les valeurs obtenues par quantification au bioimager sont exprimées en coups par minute (CPM). Les taux d'adduits sont exprimés en adduits/ 10<sup>9</sup> nucléotides en tenant compte de la quantité d'ADN, de l'activité spécifique de l'ATP, de la décroissance de l'ATP.

## **Résultats et discussions**

---

### **Chapitre I**

#### **Evaluation de la multi-contamination en mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale**

Cette partie est consacrée à l'analyse de la multi-contamination en mycotoxines dans des aliments destinés à l'alimentation humaine et/ou animale. Ces mycotoxines ont été recherchées dans les céréales brutes (riz, blé, orge) destinées à l'alimentation humaine mais aussi dans les produits finis comme le jambon, et le café. Une autre partie de ce chapitre avait pour but d'évaluer et de quantifier la présence des mycotoxines dans les aliments à destination des animaux (croquettes pour chat et chien).

Ces analyses s'inscrivaient soit dans le cadre d'une collaboration avec la République Tchèque, comparant deux méthodes d'analyse, soit répondaient à la demande spécifique d'industriel (riz, jambon, croquettes), ou à la demande de l'institut national de consommation (INC) pour le café et les croquettes de chien.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de calculer un apport journalier sur la base d'un repas type incluant ces différents produits.

Dans notre étude, six familles de mycotoxines ou groupes de mycotoxines ont été analysées, ces mycotoxines sont soit produites au champ par des *Fusaria* comme la zéaralénone (ZEA), les fumonisines (FB) et les trichothécènes (désoxynivalénol (DON et HT2), soit produites au cours du stockage par *Aspergillus* et *Penicillium* comme l'ochratoxine A (OTA), la citrinine (CIT) et les aflatoxines (AFB).

Les résultats sont présentés sous forme de diagramme en boîte à moustache (figure 66). Les boîtes à moustache affichent la valeur médiane du groupe (symbolisées par un trait horizontal noir), la moyenne (symbolisée par une croix), les intervalles interquartiles, les quartiles supérieurs et inférieurs ainsi que les valeurs extrêmes. La médiane « m » (entre parenthèse) est donnée pour chaque groupe.

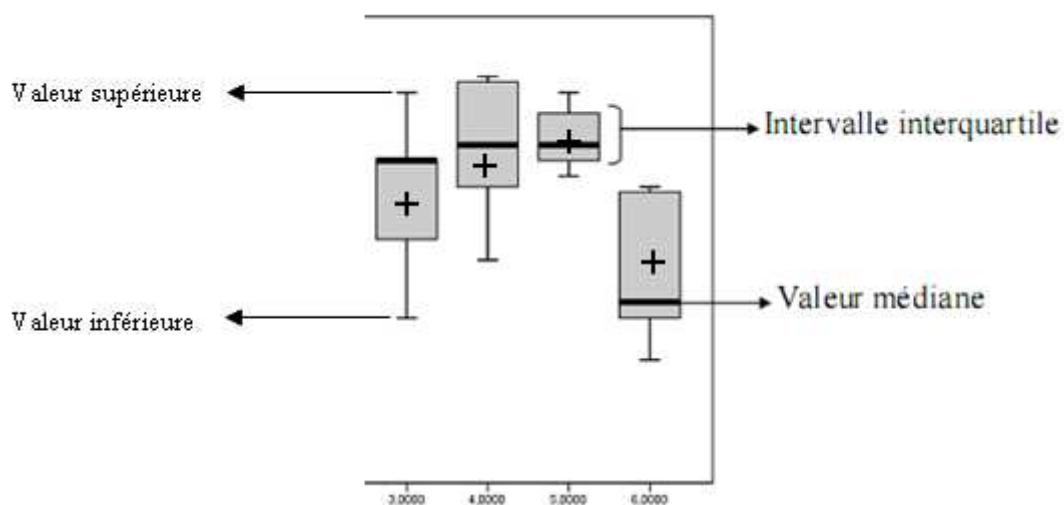


Figure 66 : Exemple de diagramme en boîte à moustache

## 1. Alimentation humaine : blé, orge, riz, café, jambon, lait

### 1.1 Les céréales

#### 1.1.1 Blé et orge

Les céréales, aliments à la base de l'alimentation humaine et animale, constituent l'un des principaux vecteurs de mycotoxines pouvant se développer entre autre lors du stockage. Des études antérieures faites au laboratoire d'analyse de contaminations en OTA, CIT, AFB, FB, ZEA ont mis en avant la présence de ces mycotoxines dans les produits finis notamment les céréales de petit déjeuner (Molinié *et al.*, 2005).

Les céréales : blé et orge, analysées durant notre étude sont d'origine tchèque et sont fournies par l'Institut Vétérinaire d'Etat d'Olomouc (24 échantillons : 14 de blé et 10 d'orge). Les échantillons numérotés « 3 » et « 1146 » sont des standards naturellement contaminés en OTA.

Deux méthodes d'extraction et d'analyse ont été comparées. Les résultats d'analyse de l'OTA et de la CIT obtenus dans les deux laboratoires (selon deux méthodes) sont résumés dans le tableau 24.

Tableau 24 : Résultats d'analyse de l'OTA et CIT dans les céréales tchèques obtenus dans le laboratoire de Génie Chimique et le laboratoire de Kromeriz (République Tchèque).

		Laboratoire de génie chimique (en milieu acide)		Laboratoire de Kromeriz (colonne IAC)
Echantillon	céréale	[CIT] en µg/Kg	[OTA] en µg/Kg (méthode en milieu acide)	[OTA] en µg/Kg (méthode IAC)
1	blé	0,93	3,95	4,12
3*	blé	0,23	12,7	8,75 (7,7±2.0 ppb)
108	blé	0,27	0,055	<LOQ
109	blé	<LOD	0,26	<LOQ
111	blé	<LOD	<LOD	<LOQ
112	blé	<LOD	0,30	0,33
113	blé	0,26	0,074	<LOQ
116	blé	0,13	<LOD	<LOQ
117	blé	0,16	<LOD	<LOQ
119	blé	<LOD	0,087	NA
121	blé	<LOD	0,069	NA
129	blé	0,28	<LOD	<LOQ
130	blé	0,34	0,078	<LOQ
1146*	blé	0,33	4,52	2,54(1,8±0,6 ppb) standard
131	orge	13,17	34,40	48,63
8	orge	1,06	0,46	0,49
106	orge	93,64	44,74	31,43
110	orge	0,52	0,47	0,67
114	orge	0,24	<LOD	<LOQ
118	orge	0,34	0,58	NA
120	orge	3,28	1,84	2,52
122	orge	<LOD	ND	NA
127	orge	1,82	<LOD	<LOQ
128	orge	0,59	0,141	<LOQ
prévalence		16/22	15/22	

\* Échantillons standards.

La première méthode d'extraction (figure 67A) est celle utilisée habituellement au sein de notre laboratoire et décrite en détail dans les articles (El Adlouni *et al.*, 2000 ; Nguyen *et al.*, 2007). Cette extraction est réalisée en milieu acide afin de permettre l'extraction simultanée de l'OTA, de la CIT et de l'AF, et permet aussi de défixer les mycotoxines de leur liaison aux protéines. Il s'agit d'une extraction par partition de phases.

La deuxième méthode est fondée sur l'utilisation des colonnes d'immuno-affinité (IAC) (OchraTest TM). Cette méthode est utilisée dans le laboratoire de Kromeriz en République Tchèque (figure 67B).

Les protocoles d'extraction et d'analyse de l'OTA dans les échantillons de blé et d'orge par les deux méthodes sont schématisés dans la figure 67. Les échantillons ont été préalablement homogénéisés. (Voir chapitre matériels et méthodes, extraction de l'OTA à partir de différentes matrices alimentaires).

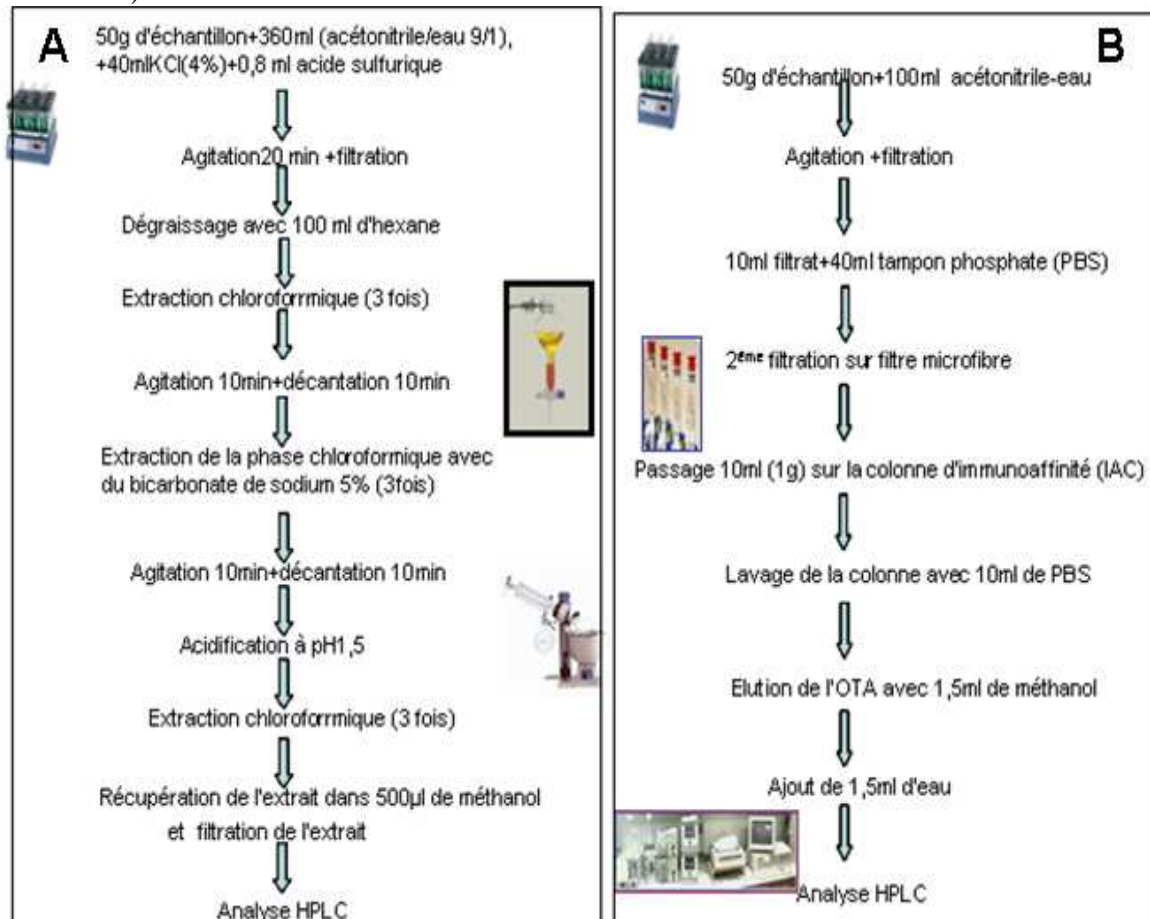


Figure 67 : Etapes d'extraction de l'OTA par la méthode en milieu acide (à gauche) et par la méthode des colonnes d'immuno-affinité (IAC) (à droite)

Les caractéristiques des deux méthodes d'extraction sont résumées dans le tableau ci-dessous (tableau 25).

Tableau 25 : Caractéristiques des deux méthodes d'extraction

	Méthode labo Génie Chimique (en milieu acide)	Méthode laboratoire de Kromeriz (colonne IAC)
Extraction	Acétonitrile-eau (9-1) acidifié (pH 1,5)	Acétonitrile-eau (60-40)
Purification	Chloroforme-Bicarbonate 5%	IAC (passage ≈1 g)
Volume final d'échantillon	500µl méthanol (équivalent de 25 g)	1,5ml méthanol +1,5ml eau
Analyse	HPLC/fluorescence 335nm/465nm	HPLC/fluorescence 333nm/477nm
Rendement en %	75,6±6,6	87±6,1
Limite de quantification(LOQ)	0,20 µg/kg	0,25 µg/kg
Limite de détection (LOD)	0,05 µg/kg	0,15µg/kg
Répétabilité	7,5%	7,2%

La méthode officielle utilisée à Kromeriz (en République Tchèque) semble avoir un meilleur rendement. Le rendement est calculé après ajout (sur-contamination) d'une quantité connue d'OTA sur des aliments. Avec la technique des colonnes d'immunoaffinité, la partie OTA liée n'est pas mesurée (voir thèse Molinié, 2004). De plus en condition alcaline, la formation de la forme ouverte d'OTA, OP-OTA, n'est pas reconnue par l'IAC (voir figure 68).

La méthode utilisée dans notre laboratoire semble avoir une meilleure sensibilité en comparaison à la méthode officielle (LOD=0,05µg/kg *versus* LOD=0,15µg/kg). Cette technique permet de mesurer l'OTA totale qu'elle soit fixée aux protéines ou transformée en forme ouverte (OP-OTA).

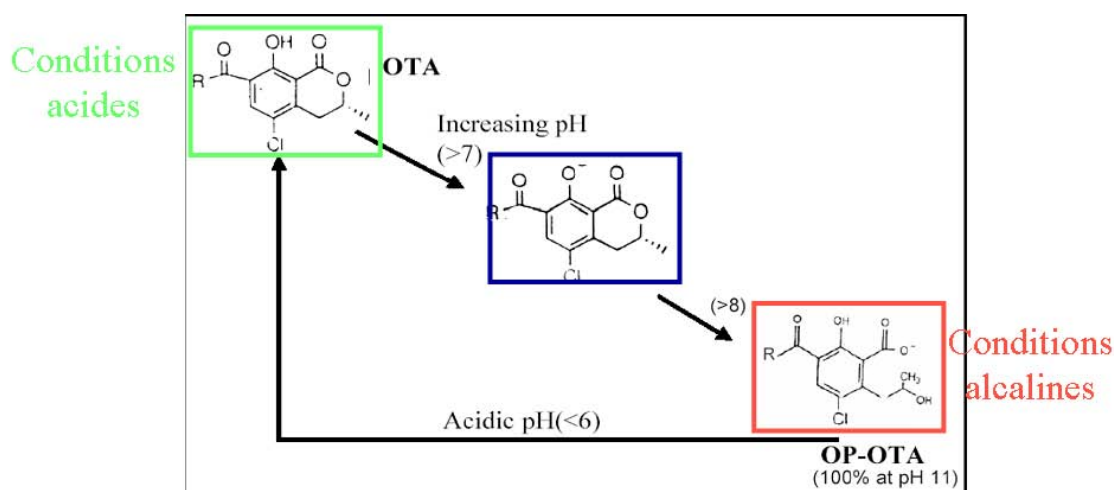


Figure 68 : Formes d'OTA selon le pH

Deux échantillons seulement ne présentent aucune mycotoxine (N° 111 & 122). Seize sur 22 contiennent de la CIT. Pour cinq d'entre eux, seule la CIT a été détectée. Pour les 11 autres, il y a en plus de l'OTA. Le taux de CIT varie de 93,6 µg/kg à 130 ng/kg. Quinze échantillons sur 22 contiennent de l'OTA. Quatre ne contiennent que de l'OTA. Les échantillons fortement contaminés en OTA le sont aussi en CIT. Les plus fortes contaminations sont observées dans les échantillons d'orge. En prenant en compte toutes les valeurs d'OTA obtenues dans les deux types de céréales, la moyenne et la médiane du groupe sont respectivement de 5,83 et 0,3 µg/kg. Pour la CIT, la moyenne et la médiane sont respectivement de 7,3 et 0,43 µg/kg (figure 69).

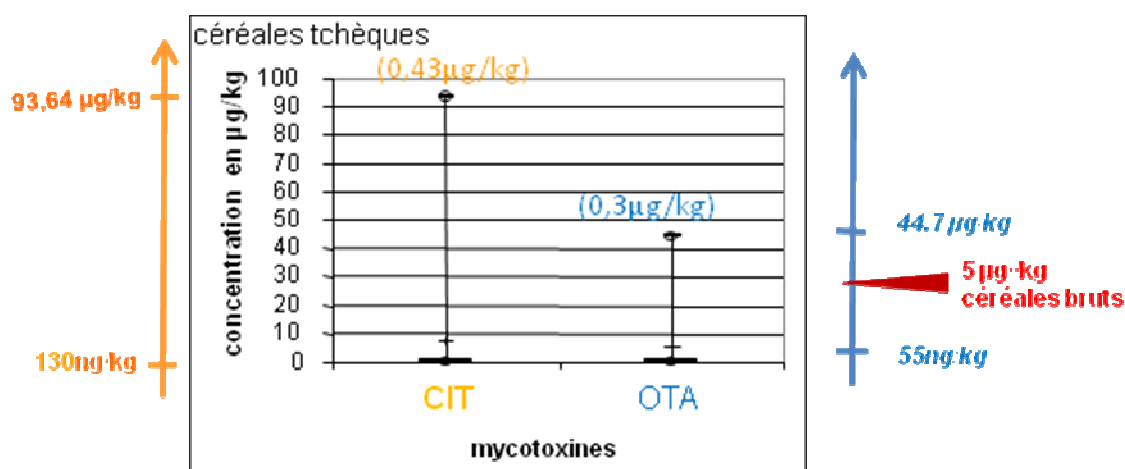


Figure 69 : Répartition des taux d'OTA et CIT dans les céréales tchèques

Si on exclut les deux valeurs les plus fortes en OTA (34,4 et 44,74  $\mu\text{g/kg}$ ) et en CIT (13,17 et 93,64  $\mu\text{g/kg}$ ), la moyenne et la médiane deviennent alors respectivement de 0,6 et 0,26  $\mu\text{g/kg}$ , pour l'OTA et de 0,73 et 0,34  $\mu\text{g/kg}$  pour la CIT (figure 70). Ces valeurs sont très inférieures aux limites maximales de résidus dans les céréales pour l'alimentation humaine.

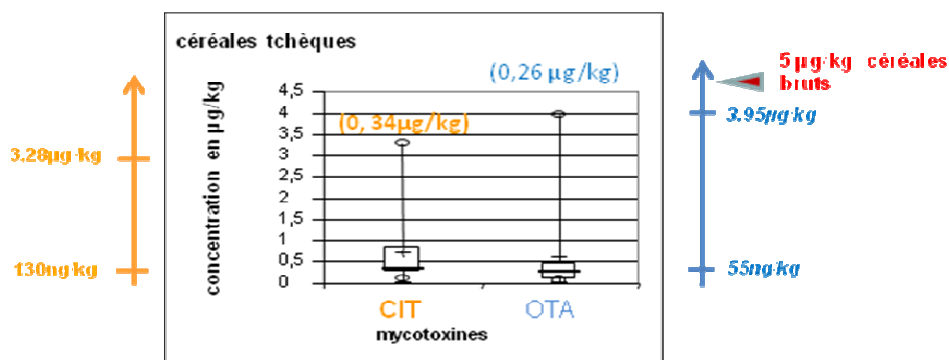


Figure 70 : Répartition des taux en OTA et CIT dans les céréales tchèques (graphe excluant les deux plus fortes valeurs)

Dans le blé, les valeurs moyennes et les valeurs médianes d'OTA sont de 0,61  $\mu\text{g/kg}$  et 0,08  $\mu\text{g/kg}$ . Pour la CIT, la moyenne est de 0,34 et la médiane est de 0,27  $\mu\text{g/kg}$  (figure 71A). Dans les échantillons d'orge analysés, la moyenne d'OTA est de 11,8  $\mu\text{g/kg}$  et la médiane est de 0,6  $\mu\text{g/kg}$ . Pour la CIT, la moyenne est de 12,7  $\mu\text{g/kg}$  et la médiane est de 1,06  $\mu\text{g/kg}$  (figure 71B). On constate que la valeur moyenne est assez différente de la valeur médiane (facteur 10 à 20 fois plus faible). En fait, il est plus intéressant de connaître la valeur médiane car elle permet de mieux refléter la répartition des échantillons.

Les échantillons d'orge sont plus contaminés aussi bien en OTA et CIT que les échantillons de blé.

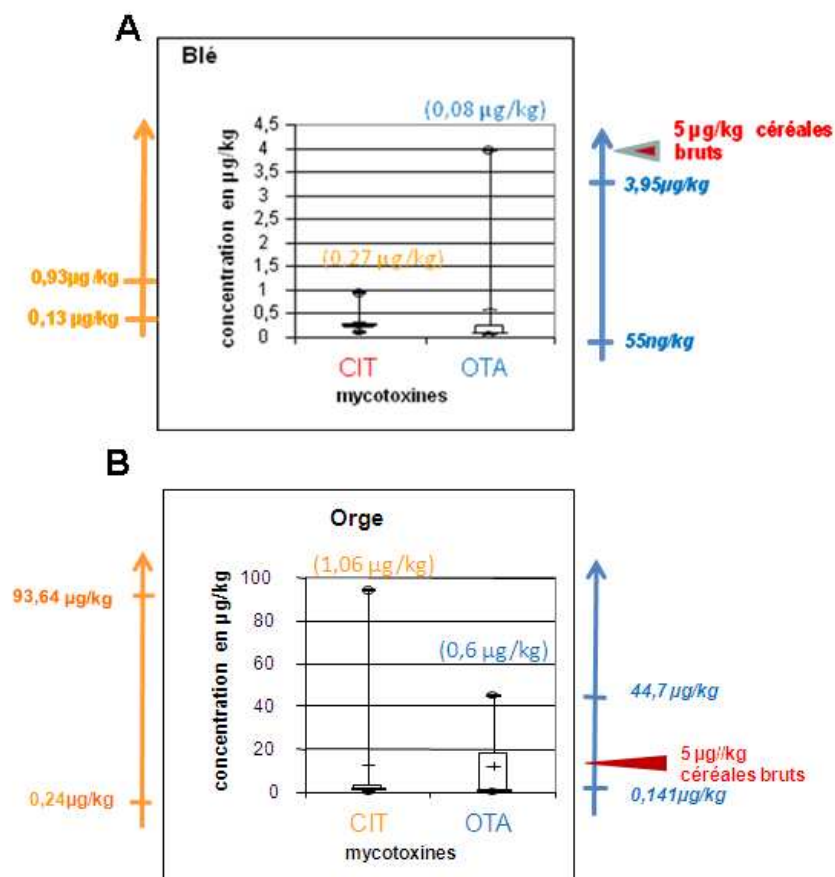


Figure 71 : Répartition des taux d'OTA et CIT dans le blé et l'orge.



Les échantillons 3\* et 1146\* sont des standards, théoriquement contaminés respectivement à  $(7,7 \pm 2 \mu\text{g/kg})$  et à  $(1,8 \pm 0,6 \mu\text{g/kg})$ . Par les deux méthodes, la quantité d'OTA est supérieure aux valeurs théoriques. Par la technique en milieu acide, les valeurs sont jusqu'à deux fois plus importantes. Il est important de noter que ces deux standards contiennent aussi de la CIT qui interfère lors de la purification sur colonne IAC (Thèse Molinié, 2004).

Notre méthode étant plus sensible ( $\text{LOD} = 0,05 \mu\text{g/kg}$ ), nous avons détecté de l'OTA à des taux faibles dans certains échantillons considérés comme non positifs avec la méthode officielle utilisant les colonnes d'immunoaffinité ( $\text{LOD} = 0,15 \mu\text{g/kg}$ ).

En utilisant la méthode en milieu acide, nous constatons que 15 échantillons sur les 22 analysés sont contaminés en OTA à des taux allant de  $55 \text{ ng/kg}$  à  $44,7 \mu\text{g/kg}$ .

Trois échantillons dépassent la valeur réglementaire d'OTA autorisée en Europe pour les céréales brutes ( $5 \mu\text{g/kg}$ ) (échantillons 106, 131 et 120).

Un échantillon de blé (7%) et cinq échantillons d'orge (50%) sont contaminés en OTA à un taux supérieur ou égal à  $0,5 \mu\text{g/kg}$  (limite autorisée pour les aliments destinés aux nourrissons et enfants en bas-âge ou valeur limite des aliments diététiques destinés à des fins médicales).

Pour six échantillons, les valeurs obtenues par la méthode officielle (IAC) sont supérieures aux valeurs obtenues par la méthode en milieu acide. Dans les échantillons où l'OTA a été retrouvée en plus grande quantité par la méthode officielle (IAC), la CIT était aussi présente. L'interférence entre l'OTA et la CIT à l'origine d'une surestimation du taux d'OTA, a été précédemment observée par Molinié lors de l'analyse du blé et des céréales du petit déjeuner (thèse Molinié, 2004). La présence d'une plus grande quantité d'OTA après extraction en milieu acide s'explique par le fait que ce traitement permet de libérer une partie de l'OTA liée sur les protéines.

Le dosage de l'OTA par les colonnes OCHRAPREP® après extraction en milieu bicarbonate, ne donne pas des résultats satisfaisants. L'extraction en milieu alcalin induit une sous estimation de la teneur réelle en OTA (thèse Molinié, 2004). Lors de l'analyse de céréales brutes (comme le maïs) et sur les céréales du petit déjeuner, il a été constaté que suivant les conditions d'extraction, une sous-estimation en AF, FB et OTA était faite par non reconnaissance ou interférence avec les anticorps (Castegnaro *et al.*, 2006a). La conversion d'OTA en sa forme ouverte OP-OTA et la présence simultanée d'OTB conduit à une sous-évaluation de la quantité d'OTA dans les échantillons. Ce problème avait déjà été soulevé lors de l'analyse de céréales du petit déjeuner (Molinié *et al.*, 2005) et dans le café (Tozlovanu & Pfohl-Leszkowicz, 2010).

Les résultats des analyses des céréales tchèques sont détaillés dans l'article : Polisenska I., Pfohl-Leszkowicz A., **Hadjeba K.**, Dohnal V., Jirsa O., Denesova O., Jezkova A. and Macharackova P. (2010) *Occurrence of Ochratoxin A and citrinin in Czech cereals-Comparison of HPLC and ELISA methods for Ochratoxin A detection. Food Additives and Contaminants* (voir annexe 1).

Nos résultats sont en adéquation avec ceux de Anne Molinié (thèse Molinié, 2004) qui avait analysé 144 échantillons correspondant à divers types de stockage durant deux campagnes de récolte de blé (2001 et 2002) en Midi-Pyrénées. Sur l'ensemble des échantillons, 60 échantillons étaient positifs en OTA dont 6 dépassaient la norme de  $5 \mu\text{g/kg}$  d'OTA (soit 4,1% du total), avec une teneur maximale de  $11 \mu\text{g/kg}$  retrouvée dans un échantillon de blé stocké à la ferme. La majorité des échantillons contaminés ( $n=46$ ) étaient à des taux inférieurs à  $3 \mu\text{g/kg}$  (thèse Molinié, 2004).

Nos résultats sont faibles comparés aux teneurs trouvées par Golinski *et al.*, 1991, dans des blés de Pologne où la gamme de contamination allait de 5 à  $2400 \mu\text{g/kg}$ . Ceci s'explique sans doute par le fait que les analyses remontent à une vingtaine d'années, période à laquelle on ne se préoccupait pas beaucoup des mycotoxines. En Allemagne et au Danemark, les niveaux de contamination du blé varient respectivement de 0,1 à  $4,2 \mu\text{g/kg}$  et de 0,8 à  $37 \mu\text{g/kg}$  (Van Egmond *et al.*, 1994). D'autres auteurs (Zaied *et al.*, 2008 ; Juan *et al.*, 2008) ont observé des taux d'OTA dans les céréales supérieurs à  $5 \mu\text{g/kg}$ . Plus récemment (en 2004 et 2005) les taux et les pourcentages de contamination en OTA dans différents types de céréales tunisiennes : 110 échantillons de blé, 103 échantillons d'orge, 113 échantillons de sorgho et 96 échantillons de riz, ont été évalués. Les incidences étaient respectivement de 38%, 40%, 38% et 28%. Les moyennes de contamination en OTA étaient respectivement de 55, 96, 44 et  $117 \mu\text{g/kg}$  pour le blé, l'orge, le riz et le sorgho. Ces valeurs sont nettement supérieures à la norme dans les céréales de  $5 \mu\text{g d'OTA /kg}$  (Zaied *et al.*, 2008).

Soixante et un échantillons de pain provenant de la zone centrale du Portugal ont été analysés pour leur teneur en OTA. 12,9% des échantillons de blé et 70% des échantillons de maïs contenaient de l'OTA. Les plus hauts niveaux d'OTA ont été mesurés dans le pain au maïs. Certains dépassaient la limite maximale européenne (5µg/kg) établie pour l'OTA dans les produits céréaliers (Juan *et al.*, 2008). Vrabcheva *et al.*, (2000), en Bulgarie au cours d'une étude dans des zones associées à la Néphropathie Endémique des Balkans, trouvaient 5 à 14 % d'échantillons positifs en CIT à des taux allant de moins de 5 µg/kg à 420 µg/kg.

Nous avons retrouvé quasiment dans tous les échantillons, simultanément de l'OTA et de la CIT. L'association de ces mycotoxines n'est pas étonnante car la flore de stockage dans les régions tempérées peut contenir aussi bien des espèces coproductrices de ces toxines comme *P. verrucosum* (Scudamore & Hetmanski, 1995) ou *P. cyclopium* (Multon, 1982), que des espèces produisant l'une ou l'autre de ces toxines (*A. flavus*, *P. Citrinum*).

Dans la majorité des échantillons analysés, les quantités en OTA sont supérieures à celle en CIT. L'inverse a été observé par Vrabcheva *et al.* en 2000, avec des taux de CIT nettement supérieurs à ceux de l'OTA. Il a été observé par Molinié (2004) que la répartition des contaminants varie d'une année sur l'autre. En effet, en 2001 le contaminant prépondérant était l'OTA, alors que l'année suivante ce sont la CIT seule ou associée à l'OTA qui prédominent (thèse Molinié, 2004). Scudamore *et al.*, (1997) ont montré que 15 échantillons de blés, sur 50 destinés à l'alimentation animale, étaient contaminés en CIT à des taux allant de 1 à 19 µg/kg.

Les mycotoxines ne sont pas détruites lors des procédés de transformation. C'est pourquoi on peut les retrouver dans les produits finis comme les céréales du petit-déjeuner. Des échantillons de céréales pour petit déjeuner (156) du marché canadien ont été analysés sur une période de 3 ans, pour la présence de DON, nivalénol, toxine HT-2, ZEA, OTA et les FB<sub>1</sub> et FB<sub>2</sub>. Les échantillons comprenaient du maïs, de l'avoine, du blé et du riz, ainsi que des céréales à grains mélangés. Ces produits sont principalement transformés par des industriels nord-américains. Globalement, le DON a été le plus fréquemment détecté (40% des échantillons analysés). Les FB et l'OTA ont chacune été détectée dans 30% des échantillons. La ZEA a été détectée dans 20% des échantillons. Le nivalénol et l'HT-2 toxine ont chacun été détecté dans un seul échantillon (Roscoe, 2008).

Contrairement à l'étude canadienne, lors des deux études (en 2002 et 2007) sur les céréales pour petit déjeuner du marché français plusieurs mycotoxines ont été détectées, parfois à des taux dépassant les limites autorisées. Ces échantillons étaient contaminés par OTA, CIT et FB simultanément. Il a été constaté que les taux d'OTA et de CIT ont fortement baissé de 2002 à 2007 (et sont voisins de la limite de détection), alors que les taux de FB ont significativement augmenté. L'explication de cette baisse est certainement le résultat de la mise en place de la législation (Molinié 2004 ; Tozlovanu 2008). En 2007, la législation pour la FB<sub>1</sub> n'était pas encore en vigueur ce qui explique très certainement la non-amélioration en FB par rapport à la première étude.

Les céréales du petit-déjeuner du marché d'Athènes ont été analysées par Villa et Markaki (2009). Les résultats ont révélé la présence d'AFB<sub>1</sub> dans 56,3% des échantillons (moyenne d'AFB<sub>1</sub> =1,42ng/g). Sept échantillons (médiane d'AFB<sub>1</sub> =3,5 ng/g) étaient contaminés à des taux supérieurs à la limite autorisée en Europe. L'OTA a été détectée dans 60% des échantillons (moyenne d'OTA = 0,18 ng/g). Dix-neuf échantillons contenaient les deux mycotoxines.

Quarante-six échantillons de céréales du petit-déjeuner du marché espagnol ont été analysés. Neuf pourcent des échantillons étaient contaminés par l'AFB<sub>1</sub> mais aucun échantillon ne dépassait la limite de quantification (0,2 µg/kg). La ZEA et l'OTA contaminaient respectivement 48 et 39% des échantillons avec des valeurs moyennes respectives de 25,4 et 0,37 µg/kg. La co-occurrence de l'OTA et de la ZEA a été observée dans 28% des échantillons. L'AFB<sub>1</sub> n'est présente que dans l'échantillon à base de maïs, tandis que la ZEA contaminait fortement le blé, et l'OTA contaminait le blé et le riz (Ibáñez-Vea *et al.*, 2011).

### 1.1.2 Le riz

Nous avons été amenés à analyser du riz provenant d'un industriel. Le riz était destiné à l'alimentation des enfants (crèche), mais également au milieu hospitalier et à une maison de retraite. Les teneurs des différentes toxines analysées sont résumés dans le tableau 26. Tous les résultats sont des résultats bruts sans rectification en fonction du rendement d'extraction. Ceci sous entend que les valeurs sont sous estimées

Tableau 26 : Taux des mycotoxines dans le riz

Echantillons	Mycotoxines du champ produite par <i>Fusarium</i>			Mycotoxines de stockage produite par <i>Aspergillus et Pénicillium</i>		
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (ng/Kg)	CIT (ng/Kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/Kg)
Riz 1	ND	15,4	ND	515	29,9	ND
Riz 2	ND	6,5	ND	ND	ND	ND
Riz 3	ND	ND	ND	9	50,4	ND

ND : non détectable

La contamination en FB<sub>1</sub> (6,5 et 15,4µg/kg) s'est avérée la plus importante, suivie de celle en OTA (9ng/kg et 515ng/kg) alors que la contamination en CIT est moins importante (29,9ng/kg et 50,4ng/kg). Le riz analysé n'est pas contaminé en AFB, ni en ZEA ni en DON. Ceci peut être dû soit à la non présence de ces toxines dans le riz brut, soit au fait que l'étuvage du riz les a dégradées.

En ce qui concerne la CIT et l'OTA, ces résultats sont comparables à ceux retrouvés dans une étude antérieure sur le riz d'origine vietnamienne. Par contre, le riz vietnamien contenait de l'AFB<sub>1</sub>, ce qui n'est pas le cas dans nos échantillons. Certains échantillons vietnamiens dépassaient la limite autorisée en Europe pour l'OTA (3µg/kg) et/ou pour l'AFB<sub>1</sub> (4µg/kg) (Nguyen *et al.*, 2007). Fréquemment, on retrouve dans le riz des co-contaminations de l'AFB avec l'OTA et la CIT. De nombreuses céréales dans les pays comme le Maroc (Zinedine *et al.*, 2006a) ou la Turquie (Herpekan *et al.*, 2006) sont aussi fréquemment contaminées simultanément par plusieurs mycotoxines.

Le taux d'OTA dans le riz est certes inférieur à la législation pour la consommation d'un Homme adulte en bonne santé (limite réglementaire : 3 µg/kg). Par contre ce riz n'est pas conforme pour une alimentation de nourrissons et d'enfant en bas âge (< 3 ans). La législation en ochratoxine pour cette catégorie d'individus est de 0,5µg/kg. Un échantillon dépasse cette limite (0,515 µg/kg). De plus d'autres formes d'ochratoxines ont été observées mais n'ont pas été quantifiées. Un autre point important est la présence simultanée de CIT, qui est connue pour amplifier les effets néphrotoxiques et cancérogènes de l'OTA (voir articles Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007, 2008 ; Pfohl-Leszkowicz, 2009).

En ce qui concerne la FB<sub>1</sub>, elle a été retrouvée dans deux échantillons sur les trois analysés, mais il est difficile de se référer à des valeurs réglementaires car la législation ne fixe aucune limite de contamination pour la FB<sub>1</sub> dans le riz. Il est mentionné sur le règlement (CE) No 1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) (JOL364 du 20.12.2006, p.5) : « Compte tenu des faibles niveaux de contamination par les toxines du *Fusarium* constatés sur le riz, aucune teneur maximale n'est proposée pour le riz ou les produits à base de riz ». A l'heure actuelle, le taux de fumonisines n'est réglementé que dans les produits à base de maïs, bien qu'elle soit retrouvée assez fréquemment dans d'autres céréales (blé, avoine). Elle a en effet été retrouvée dans les céréales de petit-déjeuner malgré l'absence de maïs dans leur formulation. Dans certains échantillons de céréales du petit-déjeuner positifs à la présence de la FB<sub>1</sub>, le riz était la seule céréale présente (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2004; Molinié *et al.*, 2005 ; Tozlovanu, 2008).

En se référant à la législation sur le maïs, le taux en FB est certes inférieur à la législation pour la consommation d'un Homme adulte en bonne santé (limite réglementaire : 800 µg/kg dans les céréales du petit déjeuner) et pour une alimentation de nourrissons et d'enfant en bas âge (< 3 ans), dont la limite est 200 µg/kg. Néanmoins le taux retrouvé de la seule FB<sub>1</sub> correspond à 10% de la limite imposée pour une alimentation de nourrissons et d'enfant en bas âge (< 3 ans). Sur la base du potentiel

cancérogène des fumonisines, le centre international de la recherche pour le cancer (IARC, Lyon) a calculé en 2002 une dose journalière tolérable de 300ng/kg poids corporel/ jour. Autrement dit un enfant pesant 10 kg ne devrait pas en ingérer plus de 3µg. Cette valeur serait donc dépassée pour une consommation de 200g de ce riz.

Il est important de rappeler que ce riz contient aussi de l'OTA ainsi que de la CIT. La présence simultanée de FB et d'OTA pose le problème du risque d'amplification des effets (Speijers *et al.*, 2004 ; Domijan *et al.*, 2006, Peraica *et al.*, 2008 ; Pfohl-Leszkowicz, 2009 ; chapitre 2).

Vu la destination de ce riz : hôpitaux, maison de retraite, crèche (soit des populations « sensibles » de part leur état physiologique), ce riz est à notre sens impropre à la consommation par ces individus car il contient de l'OTA associée à deux autres toxines FB et CIT, ayant le même organe cible (rein) et agissant en synergie comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

## 1.2 Le café

Le café après récolte lors du séchage est facilement envahi par des moisissures du type *Aspergillus*, notamment *A.Ochraceus* ; *A.carbonarius* et *A.niger* produisant l'OTA ; *A.flavus* et *A.parasiticus* pouvant produire des AF. Ces deux mycotoxines sont particulièrement dangereuses puisqu'elles sont responsables respectivement de cancers des voies urinaires et de cancer du foie. Elles ne sont que peu altérées par le procédé de torréfaction.

Une étude précédente réalisée en 2004 avait montré que les gros consommateurs de café pouvaient ingérer une quantité d'OTA équivalente à 60-80% de la dose journalière tolérable.

Le but de cette étude (à la demande de l'INC : institut national de consommation en 2010) était d'analyser l'OTA et l'AFB dans le café « boisson ». C'est-à-dire dans la tasse de café. Ceci signifie que le taux d'OTA mentionné par kg de café est 'sous estimé' par rapport à une analyse du café en grain, mais est plus le reflet de la réalité en ce qui concerne le consommateur, puisqu'aucune extrapolation concernant le passage café boisson n'est à faire.

Trente échantillons de café (6 cafés en dosettes ; 24 cafés moulus) ont servi à l'élaboration du café suivant deux techniques différentes (figure 72): café filtre ou café sous pression pour les échantillons moulus. Pour les six échantillons 'dosette' l'analyse n'a été réalisée que sur les tasses obtenues avec la machine correspondante (Nespresso ou Senseo).



Figure 72 : Les systèmes de préparation du café : A-électrique ; B-espresso ; C-nespresso ; D- senseo

### 1.2.1 Préparation du café à partir des dosettes

La préparation du café se fait à l'aide de machine à café Nespresso et Senseo.

Les capsules de « Nespresso » contiennent 5g, nous avons préparé 4 tasses de café (Par ex. : 5g\*4 = 20g pour un volume total de 125ml, pour l'échantillon 1 et 2)

Les capsules « Senseo » contiennent 7g, nous avons préparé 2 tasses de café (volume du café « boisson » non réglable, Par ex. : 7g\*2=14g pour 204ml, échantillon 3-6)

Le volume de café passé sur les colonnes d'immuno-affinité est de 30ml qui ont été dilués par du PBS (tampon phosphate pH 7,4) jusqu'à un volume total de 100ml.

### 1.2.2 Préparation du café moulu

#### 1.2.2.1 Préparation du café avec la cafetière électrique à filtre

Le café est réalisé à partir de 25g de café et 150ml d'eau. Le volume de boisson à la sortie de la cafetière est mesuré avec précision.

Le volume de café passé sur les colonnes d'immuno-affinité est de 20ml, dilués dans du PBS (tampon phosphate) jusqu'à 100ml (volume total).

#### 1.2.2.2 Préparation du café avec la cafetière à pression

Dix grammes (10 g) de café sont placés dans la dosette, 70ml d'eau sont introduites dans le réservoir d'eau. Le volume de boisson à la sortie est mesuré.

Le volume de café passé sur les colonnes d'immuno-affinité est de 25ml, dilué par du PBS jusqu'à 100ml volume total.

### 1.2.3 Quantité des aflatoxines et de l'ochratoxine A

#### 1.2.3.1 Dosage des aflatoxines

Aucun échantillon ne contient d'aflatoxine. Bien que l'aflatoxine puisse être détectée dans les grains de café, à priori l'AF ne passe pas en quantité mesurable dans le café « boisson ». Soit l'AF est détruite par la torréfaction, soit elle dégradée par l'eau chaude. Quelque soit le mode de fabrication du café, l'AF ne passe pas dans la boisson.

#### 1.2.3.2 Dosage de l'ochratoxine A

Les tableaux ci-dessous (27 et 28) donnent l'ensemble des résultats exprimés d'une part par litre de café suivant le mode de préparation, d'autre part par kg de café.

La fabrication du café par mode pression (machine « expresso » ou machine dosette) conduit à une "extraction" plus importante du taux d'OTA.

Le taux d'OTA varie de non détectable à 1,96 µg/kg de café. Cette valeur maximale est sous estimée pour deux raisons : 1) les résultats ne sont pas corrigés en fonction du rendement d'analyse (70%) ; 2) les résultats ne prennent pas en compte le taux de passage (qui n'a pas été calculé pour chaque café, et qui de plus varie d'un café à l'autre). En effet, lors de l'étude faite précédemment, nous avons observé un passage variant de 0 à 133%. Les quantités sont donc très largement sous-estimées par rapport à une analyse directe sur la poudre de café. Néanmoins dans le cadre du consommateur ceci permet de calculer la valeur exacte de l'ingéré par tasse.

Dans l'ensemble, le taux d'OTA est inférieur à 5 µg/kg, valeur réglementaire fixée par la législation européenne en 2006 pour le grain de café torréfié et torréfié moulu (figure 73).

Néanmoins, deux cafés présentent une quantité inquiétante d'OTA : l'échantillon 3 (marque U Volluto bio) et l'échantillon 4 (Marque U pur arabica).

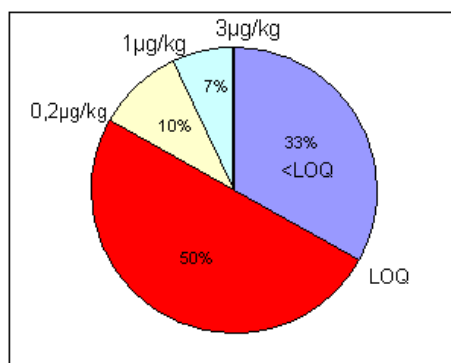


Figure 73 : Appréciation de la contamination en OTA dans le café.

Tableau 27 : Résultats des café dosettes.

Echantillon	Dénomination	ng /tasse café	ng/L café	µg/kg café	Classement
1	<b>Nespresso</b> Arpeggio	1,007	50ng	0,21	24
2	<b>Nespresso</b> Volluto	0,560	28ng	0,12	21
3	<b>Marque U</b> Volluto Bio Max Havelaar Amérique Sud	4 ,043	200 ng	1,96	30
4	<b>Marque U</b> pur arabica	2,384	119 ng	1,18	29
5	<b>Leader Price</b> Equitable max Havelaar Perou	LOQ	3	LOQ	10
6	<b>Leader Price</b> pur Colombie	<LOQ	trace	<LOQ	3

Tableau 28 : Résultats du Café moulu.

Echantillon	Dénomination	Café filtre			Café pression			Classement
		ng/tasse café	ng/l café	µg/kg café	ng/tasse café	ng/l café	µg/kg café	
7	<b>Carte noire</b>	0,051	2,6	0,012	0,04	1,5	0,008	9
8	<b>L'or intense</b>	ND	ND	ND	0,274	13	0,054	14
9	<b>Malongo</b> commerce équitable/Max Havelaar, Petits producteurs	0,972	48	0,214	0,93	40	0,195	23
10	<b>Malongo</b>	0,074	3,8	0,015	0,077	3	0,015	11
11	<b>Marque repère</b> entraidé comm. équit. Max Havelaar, Ethiopie	0,357	18	0,07	1,328	66	0,29	27
12	<b>Marque repère</b> Plantation Ethiopie	0,628	31	0,137	1,125	56	0,256	26
13	<b>Carrefour</b> agir solidaire Max Havelaar, Amérique latine	ND	ND	ND	0,506	20	0,1	16
14	<b>Carrefour</b> origine Perou	0,296	15	0,065	1,397	56	0,29	28
15	<b>Grand-mère</b>	0,096	4,8	0,02	0,380	15	0,07	18
16	<b>Jacques Vabre</b> recolte bio	ND	ND	ND	0,491	20	0,1	16
17	<b>Jacques Vabre</b> Regal	0,150	7,4	0,03	0,386	15	0,08	18
18	<b>Lavazza</b> II latino	0,115	5,8	0,024	0,540	21	0,11	20
19	<b>San Marco</b>	ND	ND	ND	0,121	4,8	0,02	12
20	<b>Monoprix</b> Ethiopie Max Havelaar gourmet	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1
21	<b>Monoprix</b> doux	0,017	0,8	0,003	ND	ND	ND	3
22	<b>Alter eco</b> comm équitable bio Max Havelaar Amérique du Sud	LOQ	Trace	LOQ	ND	ND	ND	3
23	<b>Marque U</b> équitable bio (Max Havelaar) Amérique du Sud	0,143	7	0,028	0,05	1,9	0,01	13
24	<b>Marque U</b> pur arabica	0,634	31	0,13	0,566	23	0,11	22
25	<b>Auchan</b> mieux vivre équitable. Max Havelaar	LOQ	Trace	LOQ	LOQ	Trace	LOQ	7
26	<b>Auchan</b> Brésil	1,025	31	0,211	0,258	10	0,05	24
27	<b>Dia</b> café certifié responsable Pérou	LOQ	Trace	LOQ	ND	ND	ND	3
28	<b>Dia</b> bio Mexique/Pérou	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1
29	<b>Intermarché</b> Plantation trop. Bio Max Havelaar	0,075	3,8	0,014	ND	ND	ND	7
30	<b>Intermarché</b> Planteur tropique	0,241	12	0,046	0,15	7	0,03	15

ND= non détectable ; LOD =0,03µg/kg ; LOQ =0,07 µg/kg

Pour le café le plus contaminé, une tasse de 50 ml (quantité moyenne d'un expresso) apporte 13 ng soit 0,2 ng/kg pc. Comme la DJT de l'OTA pour préserver de l'effet cancérigène est de 5 ng/kg pc, la dose de 13 ng pour un individu de 60kg correspond à 4% de la DJT. Ceci signifie que pour un gros consommateur de café (500ml-1L), l'apport journalier peut correspondre à 50% à 80% de la dose

virtuellement sûre et correspond à 12% de la préconisation du JECFA qui est de 17 ng/kg pc sur la base de la néphrotoxicité.

Il est intéressant de noter que les valeurs retrouvées sont voisines de celles obtenues lors de la première étude réalisée en 2004. Il y a une légère amélioration puisqu'aucun café ne dépasse 5µg/kg.

L'analyse du taux d'OTA dans les cafés pourrait être réalisée en s'affranchissant de la technique d'extraction en réalisant l'analyse sur le café « boisson ». Le premier avantage est de limiter l'utilisation des solvants. Le deuxième est que les quantités mesurées sont celles réellement ingérées. Le troisième avantage est que l'extraction du café étant réalisé à pH neutre, il n'y a pas de formation de la forme ouverte de l'OTA (OP-OA) qui n'est pas reconnue par les anticorps des colonnes d'immuno-affinité. L'analyse sur la boisson ne fait pas intervenir d'alcalinisation puisque le filtrat est utilisé comme 'extrait' directement passé sur colonne d'immuno-affinité. Ceci reflète donc exactement ce qui se trouve dans la tasse du consommateur.

Lors de l'étude de 2004 réalisée sur le café boisson et le café torréfié dans notre laboratoire (30 échantillons achetés dans les supermarchés français) tous les échantillons contenaient de l'OTA de l'état de trace (<LOQ) à 11,9µg/kg (Tozlovanu & Pfohl-Leskowicz, 2010). Il a été observé pour certains échantillons plus d'OTA dans le café 'boisson' que dans le café torréfié. Ceci n'est pas étonnant. Le masquage de l'OTA dans le café torréfié est connu, il a fait l'objet d'études (voir thèse Suarez-Quiroz) et est décrit dans la littérature par plusieurs auteurs (Leoni *et al.*, 2000 ; Micco *et al.*, 1989 ; Stegen *et al.*, 1997 ; Studer-Rohr *et al.*, 1995 ; Tsubouchi *et al.*, 1987 ; Suarez-Quiroz, 2004). L'intensité du masquage dépend entre autres du degré de torréfaction et de la chaleur qui conduit à l'isomérisation de l'OTA, non reconnue par les anticorps (Suarez-Quiroz, 2004 ; Studer-Rohr *et al.*, 1994, Stegen *et al.*, 2001).

Noba *et al.* (2009) ont étudié la présence d'OTA dans 30 échantillons de café prêt-à boire commercialisé au Japon. L'OTA a été détectée dans tous les échantillons de l'état de trace 0,0020-0,010 ng/ml jusqu'à 0,037 ng/ml.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Batista *et al.* (2003). Sur les 40 échantillons analysés, 58% sont infectés par des champignons potentiellement ochratoxinogénique mais seulement 22% d'entre eux étaient contaminés par l'OTA à des taux variant de 0,47 à 4,82 µg/kg, avec un niveau de contamination moyenne de 2,45 µg/kg. Les fèves de café brésilien ont été évaluées pour la présence d'espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* avant et après la stérilisation de surface. 96% des échantillons contenaient des *Aspergillii* et 42% des *Penicillia*. Après désinfection à l'hypochlorite de sodium à 1%, le taux baisse à 47% d'échantillons contenant des *Aspergillii* et 24% des *Penicillia*. 75% des isolats ont produit de l'ochratoxine A. Un tiers des 18 isolats d'*Aspergillus flavus* ont produit l'aflatoxine B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> (Batista *et al.*, 2003).

La présence d'ochratoxine A a été étudiée dans 289 échantillons de café différents au Brésil (*Coffea arabica* L.). Une quantité plus élevée de champignons filamenteux a été observée dans le café récupéré sur le sol. Les espèces de champignons appartenant au genre *Aspergillus* section *Circumdati* section *Nigri* ont été trouvées dans les échantillons de graines de café et les fèves à toutes les étapes de récolte et de transformation. Les espèces *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum* et *A. sulphureus* sont productrices d'OTA, elles ont été retrouvées dans les graines de café et les fèves de café. Dans 128 échantillons (44%), l'OTA n'a pas été détectée, mais dans 89 échantillons (31%), elle a été détectée à des taux allant de 0,1 à 5µg/kg. Dans 25% des échantillons, la contamination en OTA dépassait 5µg/kg (Batista *et al.*, 2009). En Inde, des concentrations élevées en OTA ont été retrouvées dans 74% des 80 échantillons de café (vert) destinés à l'exportation. Des concentrations de 0,2 à 13,5 µg/kg ont été enregistrées avec un taux moyen faible de 2,17± 2,45 µg/kg (Gopinandhan *et al.*, 2008). En Thaïlande, l'OTA a été retrouvée dans le café à des concentrations importantes. Trente deux échantillons de fèves séchées de café (*Coffea arabica*) à partir de deux sites de culture de « Province de Chang Mai », et 32 échantillons graines de café secs thaïlandais (*Coffea canephora* var. *Robusta*) à partir de deux sites de culture de la province de « Chumphon », ont été évalués pour la présence des champignons producteurs d'OTA. Le pourcentage global de la contamination fongique dans le café était de 98%. Après la désinfection des surfaces, il n'était plus que de 60%. Il y avait des différences écologiques remarquables dans la composition des espèces ochratoxigéniques présentes dans ces deux régions. Sur les 64 échantillons de grains de café analysés, 98% étaient contaminés par l'OTA à des taux allant de 0,6 à 5,5µg/kg pour l'Arabica et de 1 à 27 µg/kg pour le robusta (Noonim *et al.*, 2008).



### 1.3 Le jambon

Il est habituel de chercher les mycotoxines dans les céréales. Néanmoins, des études ont montré que les champignons peuvent se développer sur les produits de charcuterie. Il a été constaté dans différents pays que certaines mycotoxines pourraient être produites et accumulées sur les viandes salées sèches (Dereje, 2010).

Notre étude concerne un échantillon de jambon fumé et un autre échantillon du même fabricant et du même lot lavé et gratté avant conditionnement sous vide en vue de la vente. La commercialisation de ces échantillons avait été bloquée par les services vétérinaires à cause de la présence de nombreuses moisissures sur le jambon. Pour cette raison, afin de pouvoir continuer sa production, l'industriel nous a demandé d'analyser la présence de mycotoxines. Selon l'industriel la présence des moisissures est assez régulière. Elles sont systématiquement éliminées par un simple lavage ou brossage avant la mise en vente des produits finis.

L'échantillon de jambon fumé présentait à sa surface différents champignons. Dans un premier temps, des prélèvements de surface à différents endroits ont été effectués. Les examens microscopiques ont permis de valider que les champignons colonisateurs sont des *Aspergillii* (figure 74), ce qui nous a conduit à rechercher les mycotoxines OTA, CIT et AFB<sub>1</sub> produites par ce genre de champignon.

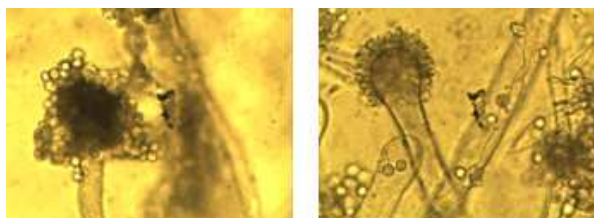


Figure 74 : Photos de champignons prélevés sur le jambon

Des prélèvements à différents endroits (figure 75) de la surface (10) et en profondeur (4) ont été effectués pour l'analyse des mycotoxines sur le jambon fumé. Sur le jambon conditionné sous vide deux prélèvements ont été réalisés, un en surface et un en profondeur.

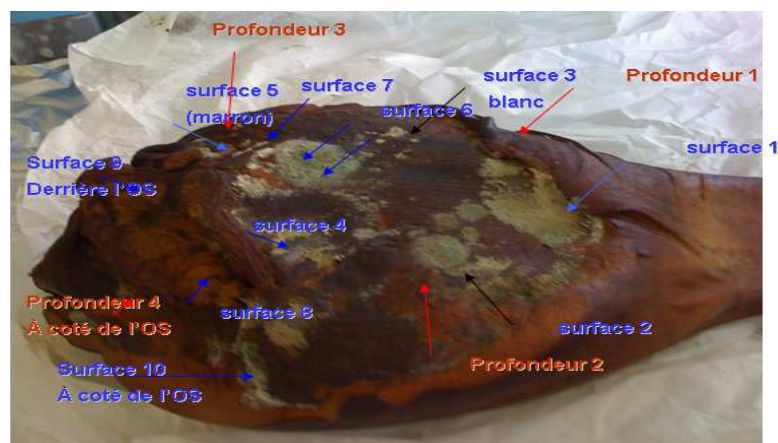


Figure 75 : Photo des différents endroits de prélèvement pour la recherche des mycotoxines

Les extractions des mycotoxines OTA, CIT et AFB<sub>1</sub> ont été réalisées selon la méthode d'extraction des mycotoxines à partir des organes (chapitre matériels et méthodes). Les résultats sont exprimés dans la figure 76 en  $\mu\text{g}$  de toxine par kg d'organe. Tous les résultats sont des résultats bruts sans rectification en fonction du rendement d'extraction. Ceci sous entend que les valeurs sont sous estimées.

Pour l'échantillon de jambon fumé, la moyenne des résultats obtenus de dosage sur la surface est de  $355,9\mu\text{g/kg}$  pour l'OTA et de  $69,5\mu\text{g/kg}$  pour la CIT. Ces mycotoxines ont été retrouvées en profondeur à des taux de  $44,7\mu\text{g/kg}$  et de  $13,1\mu\text{g/kg}$  respectivement pour l'OTA et la CIT. L'AFB<sub>1</sub> n'a pas été retrouvée dans cet échantillon.



Le jambon conditionné sous vide ne présentait pas de champignons sur sa surface, néanmoins il est contaminé en OTA à raison de 478,2 µg/kg en surface et de 71,2 µg/kg en profondeur. La CIT n'a pas été retrouvée dans cet échantillon, par contre l'AFB<sub>1</sub> a été retrouvée en surface à un taux de 0,41 µg/kg.

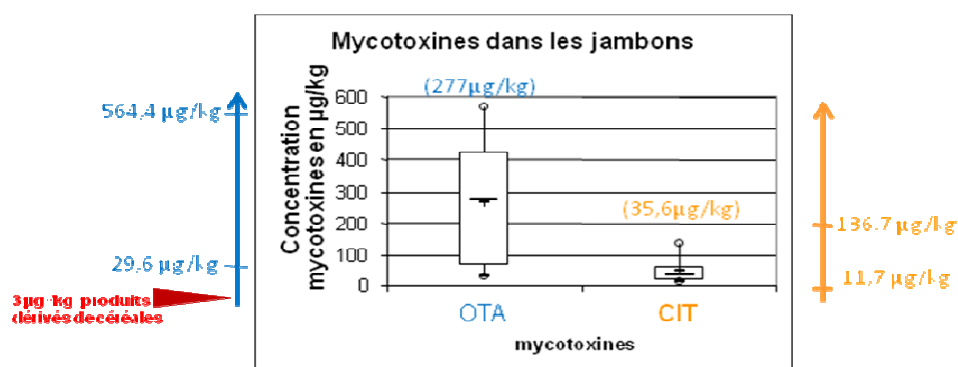


Figure 76 : Répartition des taux d'OTA et de CIT dans le jambon

Ces résultats montrent que les mycotoxines ne se retrouvent pas qu'à l'extérieur, puisque le brossage et le lavage ne sont de loin pas suffisants pour éliminer les contaminations.

Les concentrations d'OTA retrouvées dans les deux échantillons de jambon sont très importantes mais il n'est pas possible de se référer à la législation puisqu'aucune limite en mycotoxines n'est réglementée dans les produits d'origine animale. Néanmoins, si on se réfère à la législation pour un produit fini à base de céréales (3 µg/kg), les taux d'OTA retrouvés sont de 10 à plus de 100 fois plus élevés. La consommation d'une ou deux tranches de ce jambon conduirait largement au dépassement de la DJA. La quantité d'OTA présente est de 478,2 µg/kg d'aliment, ce qui vaut à 47,82 µg dans une tranche de 100g. La dose ingérée est donc 160 fois plus élevée que la DJT, si on considère un homme de 60kg.

L'échantillon de jambon conditionné sous vide d'apparence normale, contenait de l'AFB<sub>1</sub> à un taux de 0,41 µg/kg ce qui correspond à quatre fois la valeur réglementaire fixée pour les préparations à base de céréales destinées aux nourrissons et enfants en bas-âge (0,1 µg/kg). Un individu de 60kg ingérant une tranche de 100g ingère donc l'équivalent de 0,7ng/kg pc/j. Cette quantité est plus faible que la DJT qui est de 1 ng/kg pc/j mais néanmoins inquiétante puisque la consommation d'un tel aliment peut être bien supérieure à 100g.

De plus, les deux mycotoxines OTA et AFB<sub>1</sub> agissent en synergie ce qui réduit la marge de sécurité (Huff & Doerr, 1981; Wangikar *et al.*, 2005 ; Sakhare *et al.*, 2007). Des études réalisées chez l'animal pointent ce phénomène, ainsi, Verma *et al.* (2007) ont montré que l'ingestion simultanée d'OTA (1, 2 ou 4 mg/kg) et d'AFB<sub>1</sub> (0,5 ; 1 ou 2 mg/kg) par des poules pondeuses amplifie l'effet néfaste de chaque toxique prise indépendamment. Les deux toxines AFB<sub>1</sub> et OTA affectent l'utilisation de l'énergie et des protéines chez les poulets de chair, et cet effet est exacerbé lorsque les deux toxines sont ingérées simultanément (Verma *et al.*, 2002). L'AFB<sub>1</sub> et l'OTA provoquent une baisse de la viabilité cellulaire de façon dose-dépendante et augmentent la fragmentation de l'ADN. L'effet combiné de l'OTA et l'AFB<sub>1</sub> induit une toxicité plus importante que celle observée pour chaque mycotoxine seule. La fragmentation de l'ADN augmente avec les deux toxines simultanément (EL Golli-Bennour *et al.*, 2010).

Des porcs (20) ont reçu des aliments contaminés à raison de 0,68 mg d'OTA/ kg d'aliment/jour pendant 40 jours. Après l'abattage, les cuisses et la viande hachée provenant des groupes contrôle et traités ont été transformées, respectivement en jambons secs et salami. Après la maturation, l'OTA a été analysée dans ces échantillons. La quantité d'OTA dans le muscle était généralement faible. Par contre, une quantité importante a été retrouvée dans les jambons secs due à la croissance de champignons toxigènes sur leur surface pendant la maturation (Dall'Asta *et al.*, 2010). Une enquête réalisée sur différents types de jambon cru du marché italien a été réalisée. La présence d'OTA a été observée sur la surface dans 84 des 110 échantillons analysés avec une valeur médiane de 0,53 µg/kg. Dans la partie interne de 32 des 110 échantillons, de l'OTA a été retrouvée à une valeur médiane inférieure à 0,1 µg/kg (Dall'Asta *et al.*, 2010).

D'autres travaux d'Iacumin en 2009 ont mis en évidence la production d'OTA par 757 souches de champignons isolées de saucisson sec. Les espèces du genre *Penicillium* (*Penicillium nalgiovense*, *Penicillium oxalicum*, *Eurotium amstelodami*, *Penicillium olsonii*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium viridicatum* et *Eupenicillium crustaceum*) étaient fréquemment retrouvées. *Aspergillus ochraceus* a aussi été retrouvé dans un lot. 45% des échantillons contenaient de l'OTA à des taux allant de 3µg/kg à 18µg/kg. Le brossage et le lavage du saucisson a permis de réduire le taux d'OTA. Il a été conclu que la présence d'OTA n'est pas indicative d'un risque pour la santé lors de la consommation du saucisson puisque l'OTA n'a pas été détectée à l'intérieur de la viande séchée.

*Penicillium nordicum* est un contaminant connu des aliments riches en protéines et est principalement trouvé sur des produits carnés salés à sec. Il est un fort producteur d'OTA. Sonjak et son équipe (2011) ont réalisé une étude dans une usine de transformation de la viande. Étonnamment, *P. nordicum* a été isolée à partir du sel utilisé pour le salage des viandes dans la première étape de production. Douze des colonies isolées sur milieu solide à partir de 50g de sel dissous dans l'eau stérile et filtré à partir des paquets scellés ont été identifiées comme *P. nordicum*. Un nombre incalculable de colonies a été retrouvé dans un échantillon de sel provenant d'un récipient ouvert dans la zone de transformation de la viande. Dans l'échantillon de sel contrôle provenant d'un autre producteur, *P. nordicum* n'a pas été isolé. Une analyse d'air dans la zone de production et dans la chambre de séchage a mis en évidence la présence respectivement de un et de quatre isolats de *P. nordicum*. La contamination des produits de viande salée à sec par *Penicillium nordicum* représente un risque potentiel pour la santé des consommateurs et des travailleurs dans les usines de transformation de la viande où le sel de mer est utilisé pour le salage. Le sel doit être pris en compte comme une cause potentielle de contamination par l'OTA (Sonjak *et al.*, 2011 ; Schmidt-Heydt *et al.*, 2011).

## 1.4 Le lait de vaches et leurs rations

Les mycotoxines sont en général associées aux produits d'origine végétale (céréales, arachides, raisin,...) dans lesquels elles se développent. La contamination des produits animaux est une contamination secondaire du au transfert dans les organes ou le lait. Seule la teneur en AFM<sub>1</sub> est réglementée dans le lait. Elle a été retrouvée dans des échantillons de lait maternel (Mahdavi *et al.*, 2010) et dans des échantillons de poudre de lait maternisé pour nourrissons (El-Tras *et al.*, 2011). Le but des deux études suivantes est d'évaluer le transfert éventuel dans le lait des mycotoxines (OTA, ZEA, et DON).

### 1.4.1 Suivi du transfert des mycotoxines dans le lait lors d'une exposition d'une semaine

Six échantillons de lait correspondant à six vaches différentes et les cinq rations alimentaires correspondantes ont été prélevés successivement pendant cinq jours et analysés pour leur teneur en mycotoxines.

La ration est constituée d'ensilage de maïs, de blé tendre, de tourteau de soja et des minéraux. Les traites de la même vache, matin et soir ont été mélangées et constituent un échantillon. Le prélèvement de lait a été réalisé au 3<sup>ème</sup> jour par rapport aux prélèvements des rations.

#### 1.4.1.1 Dans les rations

Les toxines de champs ZEA, FB, DON et les toxines de stockage OTA, CIT, AFB<sub>1</sub> ont été recherchées dans les aliments (rations) de vaches. Les rations ont été broyées pour les analyses. Pour l'OTA, la CIT et l'AB<sub>1</sub> l'extraction a été réalisée sur 50g de ration, par partition en phase liquide-liquide selon la technique décrite par Molinié *et al.* (2005). Pour la zéaralénone (ZEA), et la fumonisine B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), l'extraction est réalisée sur 25g et 20g de ration, respectivement, l'extrait est purifié sur colonne d'immuno-affinité (IAC Libios). L'analyse du DON a été réalisée sur des kits ELISA (Libios, France).

#### 1.4.1.2 Dans le lait

Le passage et par conséquent la présence d'OTA, de ZEA et de DON dans le lait de vache ont été testés. Les échantillons de lait ont été préalablement dégraissés par chauffage à 35-37°C, centrifugés pendant 15min puis filtrés sur papier whatman n°4. L'extraction de l'OTA dans le lait a été réalisée par partition en phase liquide-liquide selon la méthode d'extraction des surnageants cellulaires comme décrit dans le chapitre matériels et méthodes. L'OTA a été analysée en mode gradient afin de séparer les éventuels métabolites de l'OTA, comme décrit par Faucet-Marquis *et al.* (2006).

La ZEA a été extraite et purifiée par passage de 30 ml de lait dégraissé sur colonnes d'immuno-affinité (Libios, France).

Les résultats de l'analyse des mycotoxines dans les rations sont résumés dans le tableau 29. Tous les résultats sont des résultats bruts sans rectification en fonction du rendement d'extraction. Ceci sous entend que les valeurs sont sous estimées. Le taux d'OTA dans le lait est certainement plus important que celui mesuré dans la mesure où nous avons éliminé la partie grasse dans laquelle s'accumule une partie de l'OTA.

Tableau 29 : Teneurs en mycotoxines dans les rations

	Les mycotoxines du champ produites par <i>Fusarium</i>			Les mycotoxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>		
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (mg/kg)	DON (mg/kg)	OTA (ng/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)
ration mélangée 20/04/210	15,1	3,5	1,6	229	ND	ND
ration mélangée 21/04/2010	10,9	2,7	2,04	52	ND	ND
ration mélangée 22/04/2010	24,8	2,9	1,2	257	ND	ND
ration mélangée 23/04/2010	ND	13,1	0,73	226	ND	ND
ration mélangée 24/04/2010	35,2	29,2	1,6	226	ND	ND

La contamination des rations par les mycotoxines de champ FB, ZEA, DON s'est révélée être très importante en comparaison aux mycotoxines de stockage OTA, CIT, AFB.

Quatre échantillons de rations sur les cinq analysés présentent une contamination en ZEA allant de 10,9 µg/kg à 35,2 µg/kg. Tous les échantillons sont positifs en FB<sub>1</sub> et en DON. La FB<sub>1</sub> est présente à des taux de 2,7 mg/kg à 29,2mg/kg. Le DON a été retrouvé à des concentrations de 0,73mg/kg à 2,04mg/kg.

L'OTA a été retrouvée dans toutes les rations à des taux allant de 52ng/kg à 257ng/kg. A l'exception de la ration 2, le taux d'OTA est assez constant. A l'inverse, on note une grande variabilité pour la FB et pour le DON. Ceci n'est pas surprenant du fait que les contaminations en mycotoxines sont hétérogènes.

Aucun des échantillons ne dépassaient les limites recommandées en mycotoxines dans l'alimentation animale, recommandations européennes 2006/576/ce du 17aout 2006 qui fixent les FB à 50 mg/kg, la ZEA à 0,5mg/kg, l'OTA à 0,25 mg/kg et le DON à 8-12 mg/kg dans les aliments pour bovins. L'AFB<sub>1</sub> est réglementée à 5µg/kg dans l'alimentation des bovins laitiers et à 50µg/kg dans les bovins destinés à l'abattage. Néanmoins, les rations présentent des co-contaminations, de ce fait il peut exister un effet synergique entre les mycotoxines rendant ainsi les valeurs recommandées obsolètes.

A l'inverse des céréales, la contamination des fourrages et des ensilages par les mycotoxines a été peu étudiée. Ceci s'explique par la faible importance des échanges commerciaux des fourrages qui sont principalement produits, conservés et consommés à la ferme. La contamination des fourrages commence au champ et se poursuit au cours des étapes de récolte, de séchage, de manutention et de stockage. Une grande partie de l'inoculum fongique est apportée par la terre au moment de la récolte, les poussières et les restes de végétaux de la récolte précédente.

La moitié des échantillons de lait analysés contiennent de l'OTA allant de 3,75ng/l à 93,5ng/l (tableau 30). Toutes les vaches ont reçues la même ration et on aurait pu penser que les quantités excrétées dans le lait seraient identiques. En analysant les métabolites d'OTA, on constate que de l'OTA sous forme de métabolites ont été transférés dans le lait, y compris dans les échantillons où on

n'a pas détecté d'OTA. En effet, on retrouve de l'OTB (forme déchloré de l'OTA), de l'OT $\alpha$  (ochratoxine dépourvue de la phénylalanine) et les formes ouvertes (OP) correspondantes de ces métabolites (OP-OTA, OP-OTB, OP-OT $\beta$ , OP-OT $\alpha$ ) (figures 77 et 78). Il est probable que ces métabolites aient été formés par action des microorganismes du rumen.

Le DON a été retrouvé dans deux échantillons à des taux de 80 et 130  $\mu\text{g/L}$ . Aucun échantillon ne contient de la ZEA. Il ne serait pas étonnant que ce soit sous forme de métabolites que la ZEA passe dans le lait, comme c'est le cas pour l'OTA. Pour vérifier ceci il faudrait modifier l'extraction en éliminant la purification sur colonne d'immunoaffinité.

Tableau 30 : Teneurs d'OTA, ZEA et DON dans le lait

Echantillons	OTA (ng/L) dans le lait	ZEA ( $\mu\text{g/L}$ ) dans le lait	DON (mg/L) dans le lait
lait 1	17,24	ND	<0,05
lait 2	3,75	ND	<0,05
lait 3	ND	ND	<0,05
lait 4	ND	ND	0,13
lait 5	93,5	ND	0,08
lait 6	ND	ND	<0,05

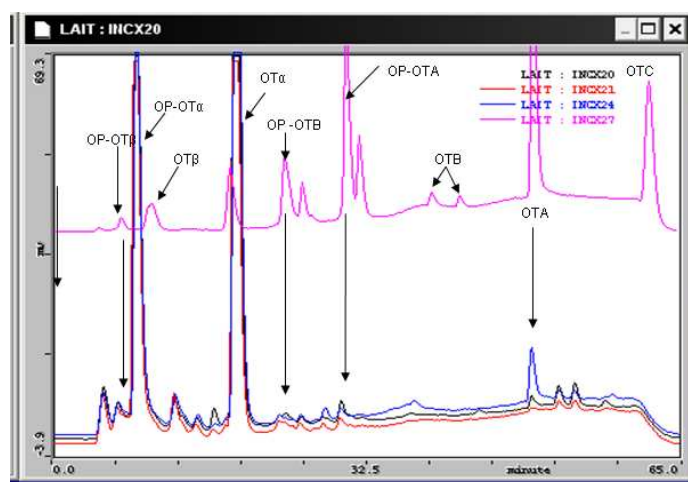


Figure 77 : Comparaison des chromatogrammes des échantillons contaminés en OTA. Lait1 (noir), lait2 (rouge), lait 5 (bleu), standards de métabolites d'OTA (rose).

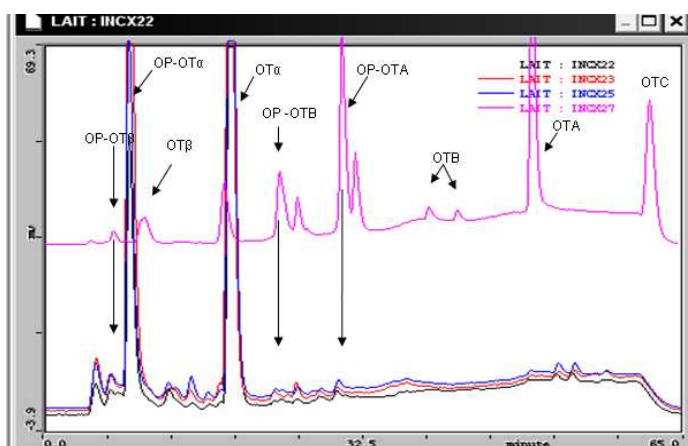


Figure 78 : Comparaison des chromatogrammes des échantillons non contaminés en OTA. Lait 3 (noir), lait 4 (rouge), lait 6 (bleu), standards de métabolites d'OTA (rose).

### 1.4.2 Suivi du transfert dans le lait suite à l'exposition à long terme (temps d'utilisation du silo)

Le passage et par conséquent la présence d'OTA et de ZEA dans le lait de vache ont été recherchés dans 20 échantillons de lait et 5 échantillons de rations avec lesquelles les vaches ont été nourries. Les extractions ont été faites comme précédemment décrites (1<sup>ère</sup> étude).

#### 1.4.2.1 Dans les rations

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 31 et 32 ci-dessous. Les deux mycotoxines recherchées sont présentes dans les rations à des taux très variables notamment pour l'OTA (tableau 31).

Tableau 31 : Teneurs d'OTA et ZEA dans les rations

Echantillons	ZEA (µg/kg)	OTA (ng/kg)
21	183,77	10
22	135,25	2
23	48,68	3
24	59,13	151,1
25	45,65	1260

LOD OTA= 0,2ng/kg ; LOQ OTA=2ng/kg ; LOD ZEA=0,1µg/kg ; LOQ ZEA=1µg/kg

Les rations présentent de l'OTA à des teneurs allant de 2 à 1260 ng/l. Elles contiennent également un taux très important de zéaralénone (45 à 184 µg/l). Les quantités de ZEA sont plus importantes en comparaison à la 1<sup>ère</sup> étude, jusqu'à 16 fois plus. Les quantités d'OTA sont moins importantes par rapport à la 1<sup>ère</sup> étude pour les trois premiers échantillons, puis la quantité augmente fortement pour la ration 24 et la ration 25 qui contient une quantité beaucoup plus élevée (600 X plus que dans les rations 22 & 23). Les rations provenaient du même ensilage. L'augmentation en mycotoxine s'explique par le fait que les mycotoxines continuent à se former lors du stockage. La ration 25 qui est la plus contaminée correspondait au fond du silo.

Comme dans l'étude précédente, aucun des échantillons ne dépasse les limites recommandées en mycotoxines dans l'alimentation animale (des bovins). Néanmoins, le fait de retrouver l'OTA et la ZEA simultanément augmente le risque du fait de l'effet synergique que pourrait avoir ces deux toxines.

#### 1.4.2.2 Dans le lait

Dans tous les échantillons de lait, des métabolites de l'OTA sont retrouvés (OTα et OP-OTA). Cinq échantillons, les 12, 13, 14, 15 et 16 contiennent de l'OTA (de 3 à 63ng/l). C'est-à-dire tous les laits correspondant à la ration 24 et un à la ration 23 (tableau 32).

Dans les laits où l'OTA est détecté, il n'y a pas de métabolites ou très peu. Il est probable que les vaches aient ingérées une quantité tellement importante d'OTA que le système de métabolisation ait été saturé. Le fait de retrouver de l'OTα dans le lait signifie que l'OTA est partiellement métabolisée au niveau du rumen avant d'être excrétée dans le lait.

En ce qui concerne la ZEA, un seul échantillon (n°6) en présente. Les métabolites de ZEA n'ont pas été analysés. Il est donc probable que ce soit sous cette forme là qu'ils sont excrétés dans le lait ou bien excrétés par une autre voie d'élimination. Une des voies de métabolisation de la ZEA est la conjugaison au sulfate et à l'acide glucuronique, métabolites qui ne sont pas éliminés par le lait mais par la bile ou l'urine.

Le lait peut donc être une source de contamination en mycotoxines. Ceci est d'autant plus grave pour les enfants (population sensible) pour lesquels cet aliment est consommé quotidiennement et dans des quantités importantes nécessaires à leur croissance. Même de faibles quantités d'OTA dans le lait sont non négligeables pour les grands consommateurs de lait.

Tableau 32 : Teneurs d'OTA et ZEA dans les échantillons de lait

Echantillons		Mycotoxines recherchées		Métabolites de l'OTA	
Rations correspondantes	Echantillons De lait	ZEA (µg/l)	OTA (ng/l)	OTα	OP-OTA
21 (27/05/2010)	1	ND	ND	+	ND
	2	ND	ND	+	ND
	3	ND	ND	+++	ND
	4	ND	ND	++	ND
22 (04/06/2010)	5	ND	ND	++	ND
	6	2,6	ND	+++	+
	7	ND	ND	++++	ND
	8	ND	ND	+++	+/-
23 (17/06/2010)	9	ND	ND	+++	+/-
	10	ND	ND	++	+/-
	11	ND	ND	++++	+/-
	12	ND	54	ND	ND
24 (29/06/2010)	13	ND	63	ND	ND
	14	ND	27	ND	ND
	15	ND	12	++	ND
	16	ND	3	++	+
25 (08/07/2010)	17	ND	ND	++	+/-
	18	ND	ND	++	+/-
	19	ND	ND	++	ND
	20	ND	ND	+	+/-

Nos résultats sont en accord avec des études norvégienne et suédoise où l'OTA a été détectée respectivement dans 12% et 14% des échantillons (Skaug, 1999; Breitholtz-Emanuelsson *et al.*, 1993). Dans notre étude sur le lait, nous nous sommes intéressés seulement à l'OTA et à la ZEA. D'autres auteurs ont recherché différentes mycotoxines dans l'alimentation et le lait des vaches laitières. Elzupir *et al.* (2009) ont recherché l'OTA et les aflatoxines dans le lait et les aliments des vaches laitières. Sur les neuf aliments analysés, six échantillons (66,7%) étaient contaminés en AF à des concentrations de 2,79 à 147,13µg/kg, et sept (77,8%) étaient contaminés en OTA à des taux de 0,22 à 1,59µg/kg. L'AFB<sub>1</sub> est la plus fréquente (5/9 échantillons) suivie de l'AFG<sub>1</sub> (2/9) et de l'AFB<sub>2</sub> (1/9). L'AFM<sub>1</sub> a été retrouvée dans trois échantillons de lait (3/5) à une moyenne de 0,16µg/l. L'OTA a été détectée dans seulement un échantillon de lait (1/5) à une concentration de 2,73µg/l.

Nos résultats peuvent sembler être en contradiction avec ceux de Gonzalez *et al.* (2007), qui ont analysé 61 échantillons de lait provenant du commerce. Aucun des échantillons ne contenaient d'OTA au-dessus de la limite de détection (0,01 ng/ml). En Allemagne, l'OTA n'a été détectée dans aucun des 121 échantillons analysés (Valenta & Goll, 1996). Néanmoins, il faut noter que dans ces études, il s'agit de lait stérilisé alors que dans notre étude, il s'agissait de lait cru. Peut être qu'une partie de l'OTA est dégradée par la stérilisation. D'autre part, les métabolites n'ont pas été recherchés dans les laits du commerce, or nous avons montré que certains des laits ne contenaient en fait que les métabolites de l'OTA.

Le lait biologique pourrait présenter un plus grand risque. Une enquête sur la présence d'OTA dans 63 échantillons de lait « bio » (39 d'origine bovine, 15 de chèvres et 9 de brebis) et 20 échantillons de lait conventionnel (non étiqueté comme « bio ») a été réalisée par Pattono et son équipe (2011). Trois échantillons « bio » des 63 échantillons contenaient de l'OTA, à des quantités variant de 0,07 à 0,11µg/l (Pattono *et al.*, 2011).

Basaran *et al.* (2007) ont mis au point une méthode d'extraction de l'OTA dans le lait en utilisant des colonnes d'immuno-affinité. Les limites de détection et de quantification sont de 0,5 et 5ng/l respectivement. En utilisant cette méthode, l'OTA n'a pas été retrouvée dans les échantillons de lait de vache (8 laits écrémés et 4 laits entiers) au dessus de leur limite de détection.

Quatorze échantillons de lait (liquide ou en poudre) obtenus dans les supermarchés et les pharmacies ont été analysés. Trois d'entre eux correspondaient à des formulations pour nourrissons à base de céréales, sept laits infantiles, deux laits crus et les échantillons restants correspondaient à du lait infantile avec des céréales. Trois des 14 échantillons étaient contaminés par les mycotoxines. Deux

correspondaient à des formules céréalières pour les bébés et contenaient de l'OTA (0,050 µg/kg). Le 3<sup>ème</sup> correspondait simplement à du lait pour bébé et contenait de l'AFM<sub>1</sub> (0,006 µg/kg) (Beltrán *et al.*, 2010). Il se pourrait que dans ces deux études, les mycotoxines n'aient pas été totalement extraites, puisque leurs méthodes d'extraction font appel à l'utilisation de solvants (méthanol ou acétonitrile) sans acidification du milieu, qui permet de défixer l'OTA. D'autre part, dans l'étude de Beltrán *et al.* (2010), des colonnes d'immuno-affinité ont été utilisées. Nous savons qu'en ce qui concerne l'AF et l'OTA, un problème majeur est l'extraction en milieu alcalin induisant l'ouverture du cycle lactone. Ces formes ne sont plus reconnues par les anticorps spécifiques des mycotoxines (Castegnaro *et al.*, 2006). Ce qui conduit par conséquent à une sous-évaluation de la quantité d'OTA.

L'OTA peut être transférée dans le lait ainsi elle a été retrouvée dans du lait de vache mais également dans le lait humain. Plusieurs études dans de nombreux pays ont mis en évidence la présence d'OTA dans le lait humain à des taux variant de 0,01 à 337 ng/l pour le cas le plus extrême au Sierra Leone (pour plus de détails voir la partie introduction bibliographique et l'article de synthèse de Pfohl-Leschowicz & Manderville, 2007). Ces études pointent du doigt le fait que dès le plus jeune âge les nourrissons peuvent être contaminés par l'OTA *via* le lait maternel ou le lait de vache.

Le lien entre les habitudes alimentaires de femmes enceintes (130) à la fois de nationalité italienne et étrangère résidant en Italie et la présence d'ochratoxine A dans le cordon, et dans le lait maternel a été étudié par l'équipe de Biasucci (2011). La consommation pendant la grossesse a été évaluée au moyen d'un questionnaire; la teneur en OTA a été déterminée dans le lait maternel et le sérum du cordon par HPLC. L'apport alimentaire moyen quotidien de l'OTA était de  $1,02 \pm 1,2$  et  $0,87 \pm 0,78$  ng/kg de poids corporel pour femmes italiennes et non italiennes, respectivement. La différence n'était pas statistiquement significative. Les échantillons de lait positifs en OTA étaient de 73% et 85% pour les mères italiennes et non italiennes, respectivement. L'ingestion de viande de porc, de boissons gazeuses, de bonbons et de vin rouge est corrélée au taux d'OTA dans le sérum. Le taux d'OTA dans le lait est lié à l'ingestion de viande de porc, bonbons, boissons gazeuses et d'huile. Une relation positive entre le taux d'OTA dans le sérum et le ratio de sérum/lait a été trouvée. L'apport d'OTA n'a eu aucun effet sur le taux de créatinine sanguine chez les mères (Biasucci *et al.*, 2011).

Le lait (colostrum) et le sang de neuf femmes allaitantes, récupérés aussitôt après l'accouchement dans un hôpital au sud du Chili, ont été analysés pour leur teneur en OTA et ses métabolites. L'OTA a été détectée dans tous les échantillons de lait humain, avec une concentration moyenne de  $106 \pm 45$  ng/l (concentration allant de 44 à 184 ng/l). Les taux d'OTα étaient de  $40 \pm 30$  ng/l (LOQ=40ng/l). Cette valeur a considérablement augmenté après l'hydrolyse enzymatique avec la β-glucuronidase et la sulfatase. Le taux d'OTα allait jusqu'à  $840 \pm 256$  ng/l. En revanche, le taux d'OTA n'a pas augmenté après hydrolyse indiquant que l'OTA n'est vraisemblablement pas excrété dans le lait sous forme de conjugué à l'acide glucuronique ou au sulfate. Les données sur l'OTA dans le lait et les niveaux signalés dans le sang de femmes au Chili sont un indicatif de transfert efficace de la mycotoxine par la lactation. L'exposition des nourrissons à l'OTA a été estimée en considérant leur apport quotidien en direct avec le lait humain aux premiers stades de leur vie. Pour la majorité des échantillons de lait, le calcul de l'apport direct d'OTA aux nourrissons indique un dépassement de la dose journalière tolérable (DJT) de 5ng/kg (pc)/ jour proposé par le groupe d'experts des pays nordiques et du Canada (Muñoz *et al.*, 2010). L'exposition des nourrissons approche les doses tolérables provisoires de 14-16 ng/kg pc/jour suggéré par le Comité mixte FAO/OMS d'experts sur l'alimentation et Additifs (JECFA) et par l'EFSA pour les adultes. Cette étude confirme la présence d'OTA dans le lait maternel à des niveaux où la DJA peut être dépassée. Ces résultats soulignent la nécessité de continuer la surveillance biologique de la nourriture et d'élaborer des stratégies alimentaires, par exemple des recommandations aux femmes enceintes et allaitantes, visant à réduire l'exposition à l'OTA dans les périodes précoces de la vie.

Les nourrissons étant nourris exclusivement dans leurs premiers mois de vie par du lait, la présence d'OTA dans celui-ci pourrait constituer un risque pour leur santé. Hassan et son équipe (2006 a et b) ont étudié l'effet de la présence de l'OTA dans le lait maternel sur les lésions rénales et le dysfonctionnement hépatique chez les nourrissons nourris au sein en Egypte. Cinquante mères allaitantes et leurs nourrissons qui ont été exclusivement nourris au sein pendant au moins quatre mois ont participé à l'étude. Trente-six mères (72%) et leurs enfants avaient été contaminés par l'OTA. L'analyse statistique a montré que la présence d'OTA était associée à des niveaux significativement plus élevés de β2 microglobulines urinaires et à de la microalbuminurie.



L'ensemble de ces études confirme que l'OTA est largement présente dans le lait et qu'elle peut avoir des effets sur les nourrissons au niveau rénal et hépatique constituant par là un risque pour la santé.

## 2. Alimentation animale : cas des croquettes pour chat et chien

Depuis quelques années, des éleveurs de chat et de chien ont observé des problèmes de santé et plus particulièrement de reproduction dans leurs élevages. Ces problèmes dans les élevages sont apparus au début des années 2000 avec un pic de témoignages dans les années 2005-2006. Les symptômes sont assez communs entre les élevages : troubles de la reproduction, avortement, chattons et chiots morts-nés ou morts quelques jours après la naissance, malformation des chatons et chiots, diarrhées, sang dans les selles, troubles urinaires, atteintes hépatiques, cancer, *etc...*

Les soucis sont liés à leur alimentation (croquettes industrielles) puisque les autres causes (virales, bactériennes,...etc) avaient été éliminées et que le changement d'alimentation améliorerait le problème. Suite à de nombreuses analyses plusieurs causes ont été écartées. Les mycotoxines ayant été suspectées, nous avons évalué leur présence dans les croquettes.

Nous avons ciblé la recherche des mycotoxines en fonction des troubles rencontrés. Dans le tableau 33, nous avons corrélié les symptômes provoqués par chaque mycotoxine.

Tableau 33 : Principaux symptômes associés aux mycotoxines

Groupe de mycotoxines	Symptômes
Aflatoxines	Atteinte hépatique- hémorragies- Immunodépression-baisse de performances-cancer-tératogénèse avec sailli des intestins.
Ochratoxines	Néphrotoxique-dysfonctionnement rénal avec augmentation de la consommation d'eau-baisse de la croissance- Diarrhées -lésions du foie, des reins et de la vessie-modifications hématologiques-cancer-tératogénèse
Zéaralénone	<p>Truie :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Œdème de la vulve et du vagin-prolapsus vaginal ou rectal-hypertrophie de l'utérus-atrophie des ovaires- diminution de la prolificité-avortement-infertilité-retours en chaleur avec cycles décalés, refus de saillie.</li> </ul> <p>Verrat :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tuméfaction de la chaîne mammaire-œdème du prépuce-atrophie testiculaire-anomalie de la semence.</li> </ul> <p>Porcelet :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Inflammation voire nécrose de la vulve et de la chaîne mammaire-splay leg (jambe écartée).</li> </ul>
Tricothécènes	Troubles digestifs (vomissement, diarrhées)-anorexie-hémorragies-lésions buccales et dermiques-immunotoxicité- baisse de la consommation et baisse des taux de croissance
Fumonisines	Immunotoxique- atteintes rénales et hépatiques- troubles sanguins et neurologiques

### 2.1 Croquettes de chat

Quarante trois échantillons de croquettes de chat de différentes provenances ont été analysés, 36 provenant d'élevage et 7 provenant d'un industriel.

Les familles de mycotoxines recherchées sont celles produites au champ par le genre *Fusarium* (FB, ZEA, DON) et celles produites au cours du stockage par les genres *Aspergillus* et *Penicillium* (OTA, CIT, AFB). Tous les résultats (en µg/kg d'aliment) sur les croquettes ne prennent pas en compte le rendement d'extraction. Ce qui veut dire qu'en fait il y en a en réalité plus que ce qui est indiqué.

#### 2.1.1 Provenant de plusieurs élevages de chats

A la demande de plusieurs éleveurs de chats, nous avons analysé des croquettes ayant posé des problèmes de santé aux animaux.

Les croquettes 1 à 27 (tableau 34) n'ont été analysées que pour leur teneur en mycotoxines de champ (ZEA, FB, DON), à l'exception des échantillons 2, 10 et 27 où l'OTA a été recherchée. Seul l'échantillon 2 contenait de l'OTA à un taux de 1µg/kg. Dans l'échantillon 25, l'AFB<sub>1</sub> a été retrouvée à une concentration de 1µg/kg. Dans les échantillons 28 à 36 (tableau 35) toutes les mycotoxines ont été recherchées (de champ et de stockage).



Tableau 34 : Analyse des croquettes de chat provenant d'éleveurs effectués en sous-traitance.

Echantillons		Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			
nom	Marque	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	FB <sub>2</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)
1	Royal canin Kitten precision 38	30	1620	585 (FB=2210)	35
2	Royal canin hair skin	75	3010	945 (FB=3955)	110
3	Eagles pack super premium lot28-29p2	80	2770	460 (FB=3230)	130
4	Léonardo cat Premium adult L311MHD05-2009	10	60	10 (FB=70)	40
5	Léonardo cat Premium kitten L 263MHD0308	10	<LOD	<LOD	55
6	Léonardo cat adult 233MHD02-2009	35	135	15 (FB=150)	185
7	Yarrah bio adult poulet NL15606/A4	10	345	90 (FB=435)	20
8	Nutro complete care chat poulet	40	3770	2280 (FB=6050)	15
9	Eagles pack adult poulet	125	2670	565 (FB=3235)	110
10	Hills science plan adult poulet	100	120	80 (FB=200)	145
11	Royal canin Exigent	90	30	<LOD	100
12	Almo adult poulet	<LOD	330	40 (FB=370)	20
13	Almo adult saumon	<LOD	445	50 (FB=495)	<LOD
14	Hills adult agneau	180	655	315 (FB=970)	155
15	Hills adult lapin	245	280	80 (FB=360)	280
nom	Marque	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	FB <sub>2</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)
16	Mastery adult	125	440	130 (FB=570)	75
17	Royal canin kitten persian 32	<LOD	170	25 (FB=195)	25
18	Eagles pack holistic poulet	<LOD	235	20 (FB=255)	20
19	Mastery kitten calcium vit D	175	405	70 (FB=475)	65
20	Hills prescription science Diet feline (vété)	255	125	20 (FB=145)	185
21	Iam's adulte saumon	100	100	<LOD	200
22	Iam's adulte agneau	115	210	<LOD	135
23	Royal canin skin and care	120	170	30 (FB=200)	<LOD
24	Almo nature kitten poulet	20	210	<LOD	25
25	Eagles pack holistic adult canard	10	100	25 (FB=125)	45
26	Eagles pack holistic adult kitten poulet	20	240	20 (FB=260)	30
27	Royal canin persian 30	104	160	160 (FB=320)	55

(NA: non analysé, ND<LOD, LOD ZEA=10 µg/kg ; LOD DON=20µg/kg ; LOD OTA=0,5mg/kg ; LOD AF=1mg/kg ; LOD FB= 10 µg/kg).

Tableau 35 : Analyse des croquettes de chat provenant d'éleveur effectué au sein de notre laboratoire

Echantillon		Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>				Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>			
Nom	Marque	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	FB <sub>2</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Autres AFB
28	Mastery baby/mummy	46,39	333,60	168,73 (FB=502,33)	215	ND	0,17	1,32	G2, G1, B2
29	Mastery adult poisson	57,56	156,20	69 (FB=225,2)	219,5	0,94	0,74	1,87	G2, G1, B2
30	Mastery adult poulet	56,61	102,95	41,61 (FB=144,56)	361	1,24	ND	0,92	G2, G1, B2
31	ORIEN	métabolite	55,80	N.A	19,3 <LOQ	0,044	<LOD	<LOD	G2, G1, B2
32	ORIEN	18,33	252,1	N.A	8,9	0,344	<LOD	0,0274	G2, B2
33	Proplan adult poisson	133,63	110,43	N.A	104,7	0,074	0,13	ND	G2, G1, B2
34	Mastery baby/mummy	41,86	157,95	N.A	320,5	0,177	<LOD	<LOD	G2, G1,
35	HILL'S natures best	134,16	204,55	N.A	392,4	0,115	1,17	ND	G2, G1, B2
36	HILL'S ball control	136,82	263,69	N.A	500,1	0,068	1,24	ND	G2, G1, B2

(N.A : non analysé, ND: non détectable, ND<LOD) (LOD ZEA=0,5µg/kg, LOD FB=3µg/kg ; LOD OTA=0,03µg/kg ; LOD CIT =0,1 µg/kg, LOD AF=0,02µg/kg; LOQ DON=40µg/kg,).

Tous les échantillons présentent des co-contaminations de plusieurs mycotoxines (au moins deux). Le pourcentage de co-contamination est présenté sur la figure 79. La FB est fréquemment associée à la ZEA et au DON à des concentrations importantes.

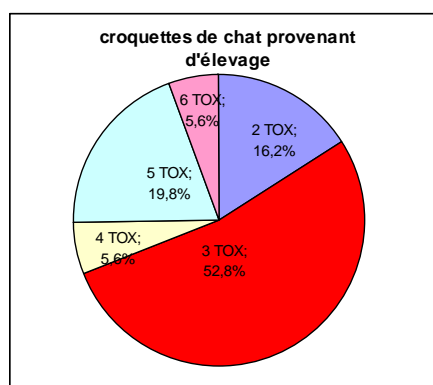


Figure 79 : Appréciation globale des co-contaminations dans les aliments de chat provenant d'élevage

Trente un échantillons sur 36 analysés (86%) présentent une contamination en ZEA. Un des échantillons ne présente pas de contamination en ZEA, mais la présence d'un dérivé de la ZEA. Il s'agit sans doute d'un précurseur de ZEA.

Trente cinq échantillons sur les trente six analysés (97%) contiennent de la FB<sub>1</sub>. Dans 25 sur 30 échantillons analysés (83%), la FB<sub>2</sub> est présente. Le taux de FB<sub>1</sub> est plus important que celui de FB<sub>2</sub>. Le DON est présent dans 34 échantillons (94%).

Neuf des 12 échantillons analysés (75%) sont contaminés en OTA. La CIT est souvent associée à l'OTA.

L'AFB<sub>1</sub> a été détectée dans 6 sur 10 échantillons analysés (60%). D'autres aflatoxines ont été détectées en plus de l'AFB<sub>1</sub>, à savoir les aflatoxines B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> à des taux non négligeables, mais elles n'ont pas été quantifiées.

L'AFB<sub>1</sub> est la seule mycotoxine réglementée dans l'alimentation animale (ovin, porcin, bovin). Pour les autres mycotoxines, seules des recommandations ont été édictées. Dans la majorité des cas, ces recommandations concernent les aliments pour les animaux de ferme (les porcs et les volailles) et sont faites surtout pour éviter des effets toxiques aigus. Les animaux familiers ne sont mentionnés que pour les fumonisines mais avec un seuil unanimement considéré comme trop élevé.

Nous avons comparé les résultats obtenus d'une part à la recommandation animale et d'autre part à la réglementation pour nourrissons et enfants en bas-âge (figure 80 et 81). Les seuils réglementaires sont résumés dans le tableau 36.

Tableau 36 : Législation mycotoxines dans nourriture humaine et recommandation pour porc

Législation/recommandation	Bébé/enfants < 3ans	Adulte humain	porc
OTA	0,5 µg/kg	3 µg/kg (céréales transformés)	50 µg/kg
AF	0,1 µg/kg	2µk/kg (céréales transformés)	20 µg/kg
ZEA	20 µg/kg	50 µg/kg (céréale du petit-déjeuner)	50 µg/kg
FB	200 µg/kg (produits à base de maïs)	800 µg/kg (céréale du petit déjeuner)	5000 µg/kg
DON	200 µg/kg	500 µg/kg (céréale du petit-déjeuner)	500 µg/kg

Il n'est pas possible d'extrapoler ces recommandations aux aliments d'animaux de compagnie, car les doses autorisées pour les porcs ou volailles sont calculées pour une durée de vie courte (le temps de l'élevage avant de les transformer en viande), alors que pour les chiens et chats, il faut prendre en compte toute la durée de vie. De plus, les chats et chiens sont susceptibles de manger le même aliment toute une vie et donc seront exposés de manière répétitive avec risque d'accumulation des mycotoxines.

D'autre part, le métabolisme des félins et des carnivores est très différent de celui des ovins, bovins et porcins. Vu la taille des animaux et leur susceptibilité, il semble plus logique de s'appuyer sur les seuils établis pour les nourrissons et les enfants en bas âge.

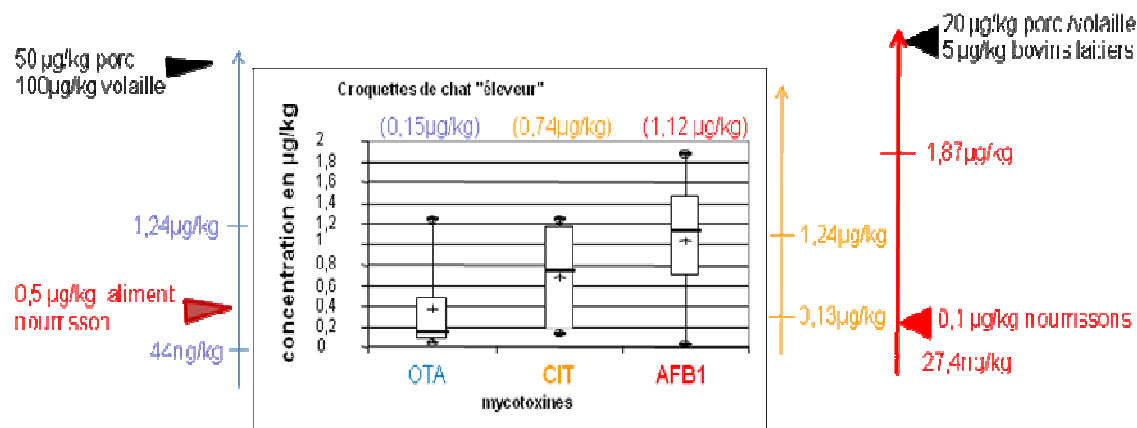


Figure 80 : Répartition des taux d'OTA, de CIT et d'AFB<sub>1</sub> dans les croquettes de chat provenant d'éleveur

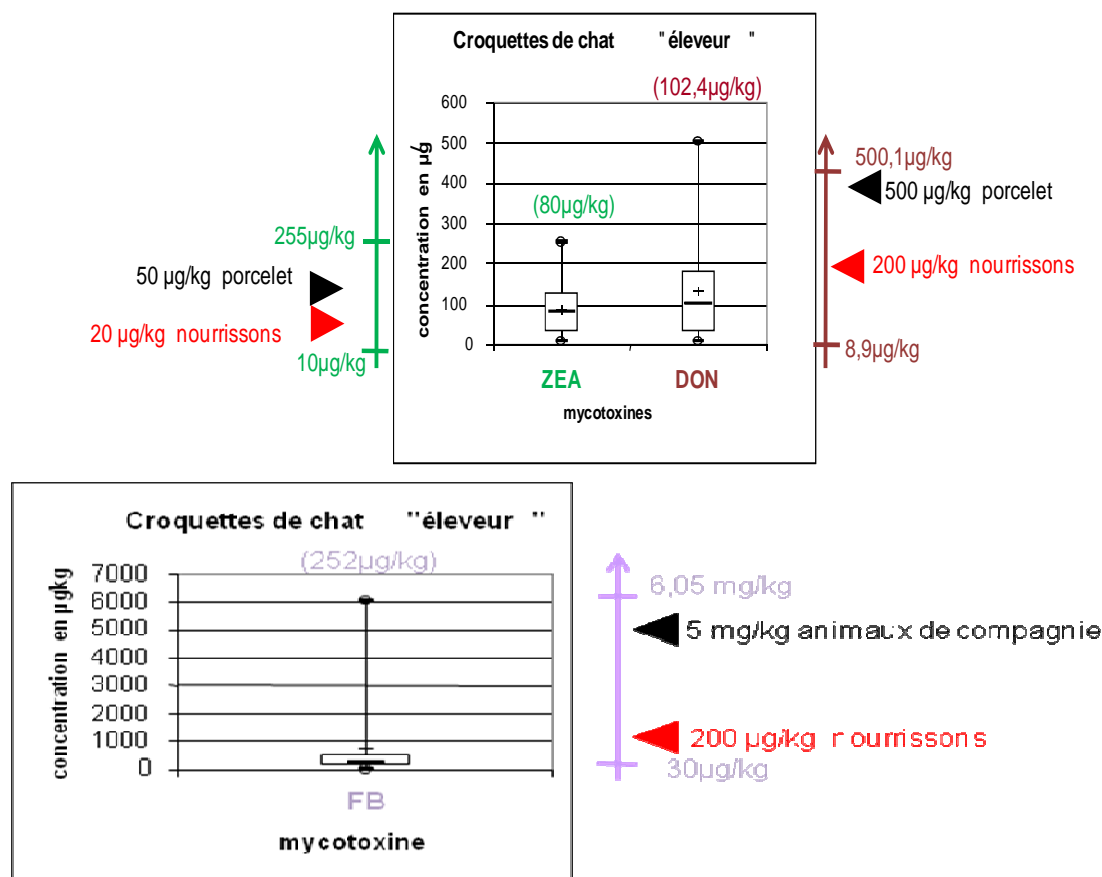


Figure 81 : Répartition des taux de ZEA, DON et FB dans les croquettes de chat provenant d'éleveur

#### 2.1.1.1 Comparaison aux recommandations animales

Dix neuf échantillons (53%) dépassent la limite recommandée en ZEA (50 µg/kg) pour les aliments pour les porcelets et les jeunes truies. L'échantillon 20 dépasse cette valeur de plus de 5 fois. Quant aux fumonisines, l'échantillon n°8 (6,05 mg/kg) dépasse la limite réglementée en FB chez les animaux (5 mg/kg).

Un échantillon dépasse légèrement la limite autorisée du DON en alimentation animale pour les porcelets estimée à 500 µg/kg (500,1 µg/kg).

Aucun échantillon ne dépasse les valeurs recommandées en alimentation animale en Europe pour l'OTA et pour l'AFB<sub>1</sub>.

#### 2.1.1.2 Comparaison à la législation humaine

Dans plusieurs échantillons, les taux de mycotoxines sont supérieurs à ceux autorisés pour des nourrissons ou enfant en bas âge (<3 ans, 15 kg).

Vingt quatre échantillons (66%) présentent une contamination en ZEA dépassant largement (1,5 à plus 6,5 fois) la limite autorisée pour les nourrissons et enfants en bas âge. Deux échantillons sont à la limite fixée à 20 µg/kg.

Pour les fumonisines (FB), la réglementation pour les préparations à base de maïs et pour les aliments « bébé » destinés aux nourrissons et enfants en bas âge (200 µg/kg) a été dépassée dans 18 échantillons avec des concentrations étant jusqu'à 30 fois supérieures à celle-ci. Deux échantillons sont à la limite fixée à 200 µg/kg.

Huit échantillons contiennent des teneurs en DON supérieures (jusqu'à 2,5 fois) ou égales à la valeur recommandée pour les aliments de nourrissons (200 µg/kg).

Trois échantillons dépassent (de 2 à 2,5 fois) la limite autorisée en OTA (0,94 ; 1,24 et 1 µg/kg) dans les préparations à base de céréales et aliments destinés aux nourrissons et enfants en bas

âge (0,5 µg/kg). La limite autorisée en AFB<sub>1</sub> chez les nourrissons (0,1µg/kg) a été dépassée entre 9 à 18 fois dans quatre échantillons.

### 2.1.1.3 Corrélation ingrédients/mycotoxines

Les croquettes industrielles sont constituées en grande partie de matériel végétal notamment de céréales (maïs, riz, blé, soja, orge, *etc.*). Comme les mycotoxines sont fréquemment retrouvées dans les matières premières d'origine céréalières et qu'elles résistent aux procédés de transformation et à la chaleur, ces mycotoxines se retrouvent dans les produits finis (croquettes).

Le maïs est la céréale la plus utilisée (27 croquettes) dans la fabrication des croquettes de chat. Le riz rentre dans la constitution de 22 croquettes, quant au blé, il est retrouvé dans seulement cinq échantillons. Le seigle, l'avoine et le soja sont peu utilisés dans la fabrication des croquettes, ils sont retrouvés respectivement dans seulement 3, 4 et 7 échantillons.

Contrairement à ce qui est couramment admis, la présence des FB n'est pas seulement liée à la présence de maïs. En effet, dans les échantillons 6 et 20, nous avons retrouvé des FB malgré l'absence de maïs. Dans ces deux croquettes, le riz est la principale voire la seule céréale. Dans l'échantillon 5, les FB n'ont pas été détectées bien que plusieurs céréales constituent cet aliment (maïs, riz, seigle et lin). La teneur la plus élevée en FB (6,05mg/kg) a été retrouvée dans l'échantillon 8. Ce dernier est constitué essentiellement de maïs, riz, lin et de pulpe de betterave. La seule différence avec l'échantillon 5 c'est la pulpe de betterave, qui pourrait être source de contamination. Les échantillons 2, 3, 9 également fortement contaminés en FB contiennent de la betterave. Elle pourrait être responsable en partie de cette contamination. Néanmoins ceci n'est pas prouvé dans la mesure où d'autres croquettes contiennent de la betterave et sont peu contaminées en FB (11, 13, 15, 17, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 35).

Seules les croquettes de la marque Orijen (échantillon 31 et 32) n'utilisent pas de céréales dans leur formulation, elles sont constituées d'ingrédients d'origine animale et d'autres végétaux que les céréales (voir tableau ingrédients en annexe 5). L'échantillon 31 de cette marque contient des teneurs faibles en mycotoxines. Ce qui explique les bons résultats obtenus avec cet aliment sur la santé des animaux. En effet, avec cette croquette, les chattes ont de nouveau eu des portés en bonne santé. Mais cela n'est pas complètement vrai puisque un autre échantillon (32) de cette même marque lors du changement du lot contenait une quantité non négligeable de FB et de ZEA. Il est à noter que ces produits contiennent des soies de maïs, des graines de lin et de la luzerne séchée. Ces derniers pourraient être à l'origine de la présence des mycotoxines.

Dans certains échantillons, une seule céréale est présente mais suffit à les contaminer en plusieurs mycotoxines. A titre d'exemple, l'échantillon 20 contient des quantités élevées en ZEA, FB et DON alors que le riz est la seule céréale rentrant dans sa composition.

Ceci peut être expliqué par le fait que ces trois mycotoxines peuvent être produites par un même champignon (*Fusarium*).

Deux céréales (maïs et riz) font partie des ingrédients des échantillons 10 et 36, qui les contaminent avec des quantités importantes en plusieurs mycotoxines (ZEA, FB et DON).

Il est difficile d'établir ou de prédire la présence des mycotoxines dans les croquettes en fonction des ingrédients. Ce qu'il faut prendre en considération c'est plutôt la qualité de chaque constituant.

### **2.1.2 Provenant d'un industriel**

Un industriel a été interpellé par les résultats des mycotoxines dans les croquettes et des fréquentes plaintes des éleveurs et des propriétaires de chat.

En vue d'améliorer la formulation de son produit, plusieurs échantillons de croquettes de chat ont été analysés. Les résultats sont résumés dans le tableau 37 (exprimés en µg/kg d'aliment).

Tableau 37 : Analyse des croquettes de chat provenant d'industriel effectuées au sein de notre laboratoire.

Echantillon	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>		
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)
A	123,1	18640	760	0,047	NA	0,050
B	105,9	2130	1600	0,026	NA	0,089
111/10	ND	1860	100	0,408	0,61	ND
112/10	23,9	6610	70	0,377	0,54	ND
182/10	37,05	23,6	150	0,18	0,32	ND
239/10	34,7	517,9	170	4,53	0,23	ND
252/10	22,9	680,7	260	1,98	7,23	ND

(N.A : non analysé, ND: non détectable, ND<LOD) (LOD ZEA=0,5µg/kg, LOD FB=3µg/kg ; LOD OTA=0,03µg/kg ; LOD CIT=0,1 µg/kg, LOD AF=0,02µg/kg; LOQ DON=40µg/kg).

Tous les échantillons sont contaminés par plusieurs mycotoxines (au moins 4). 85,7 % des échantillons présentent une co-contamination de cinq mycotoxines et 14,3% présentent des co-contaminations de quatre mycotoxines (figure 82).

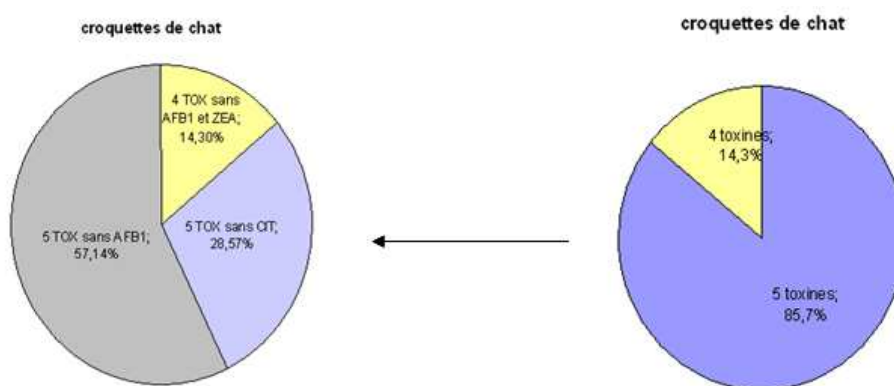


Figure 82 : Appréciation globale des co-contaminations dans les aliments de chat provenant d'industriel

Deux produits contiennent des taux élevés de FB entre 6,6 et 18 mg/kg, c'est-à-dire des taux nettement supérieurs à la recommandation pour animaux familiers (5 mg/kg). L'évolution de la formulation a conduit à modifier le taux de mycotoxines dont certains ont nettement diminué comme la ZEA et la FB, bien qu'encore trop élevé par rapport à la législation infantile (respectivement 20µg/kg et 200µg/kg). A l'inverse, la contamination en OTA et CIT a considérablement augmenté.

Certains échantillons étaient homogènes et d'autres composés de plusieurs types de granulés (voir figure 83), notamment, l'échantillon 182/10 était constitué de trois types de granulés (rond jaune, rond marron et bâtonnet marron). L'échantillon 239/10 était constitué de granulés rond marron et bâtonnet marron. Nous avons séparé et analysé chaque constituant de ces échantillons seul. Les résultats sont résumés dans le tableau 38.



Figure 83 : Composition des croquettes (A : bâtonnet marron ; B : rond marron ; C : rond jaune)

Tableau 38 : Analyse de chaque constituant des croquettes de chat provenant d'industriel effectuées au sein de notre laboratoire.

Echantillon	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>		
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)
182/10 rond marron	38,13	77,7	<LOD	0,15	0,25	ND
182/10 bâtonnet marron	43,15	16,9	180	0,22	0,45	ND
182/10 rond jaune	70,1	48,9	90	0,25	0,19	ND
182/10 Mélange	37,05	23,6	150	0,18	0,32	ND
239/10 rond marron	87,4	384,2	160	2,7	1,6	ND
239/10 bâtonnet marron	12,1	491,9	110	1,2	0,4	ND
239/10 Mélange	34,7	517,9	170	4,53	0,23	ND

Après tri de l'échantillon 182/10, il apparaît que les granulés ronds jaunes sont les plus contaminés en ZEA, jusqu'à 2 fois plus que dans le mélange. Les bâtonnets contiennent le plus de DON. Les granulés ronds marron présentent le taux le plus élevé en FB<sub>1</sub>. En ce qui concerne l'OTA et la CIT, le taux est plus au moins équivalent entre les 3 constituants.

Dans le mélange, le taux de mycotoxines ne correspondent pas forcément à la somme du taux retrouvé dans chaque constituant, ceci n'est pas étonnant, car la quantité de chaque constituant est différente.

Suite à ces résultats, les granulés ronds jaunes ont été éliminés de la formulation de l'échantillon 239/10. L'élimination de cet élément n'a pas suffi à faire diminuer significativement le taux de mycotoxines. Cela s'est même traduit par une nette augmentation du taux de FB<sub>1</sub> (20 fois plus) et d'OTA (25 fois plus). Les taux de ZEA et de CIT ont légèrement diminué, bien que l'élément rond marron soit nettement plus contaminé dans la 2<sup>ème</sup> formulation que dans la première. Dans cet élément rond marron toutes les mycotoxines ont augmenté.

Nous avons comparé les valeurs à celles de la réglementation pour nourrissons et enfants en bas-âge et aux recommandations animales (figure 84 et 85).

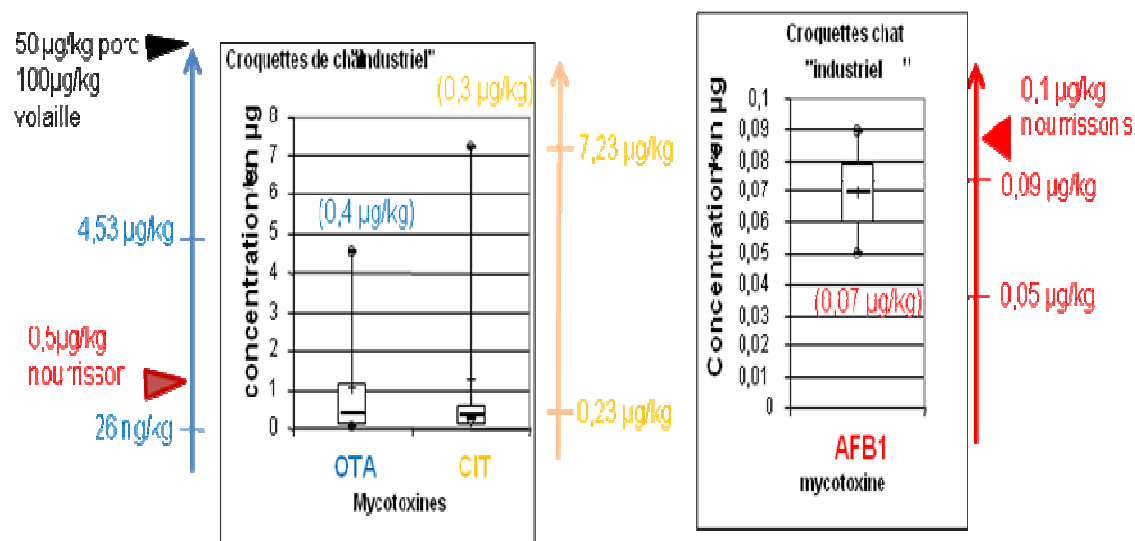


Figure 84 : Répartition des taux d'OTA, de CIT et de AFB<sub>1</sub> dans les croquettes de chat provenant d'industriel.

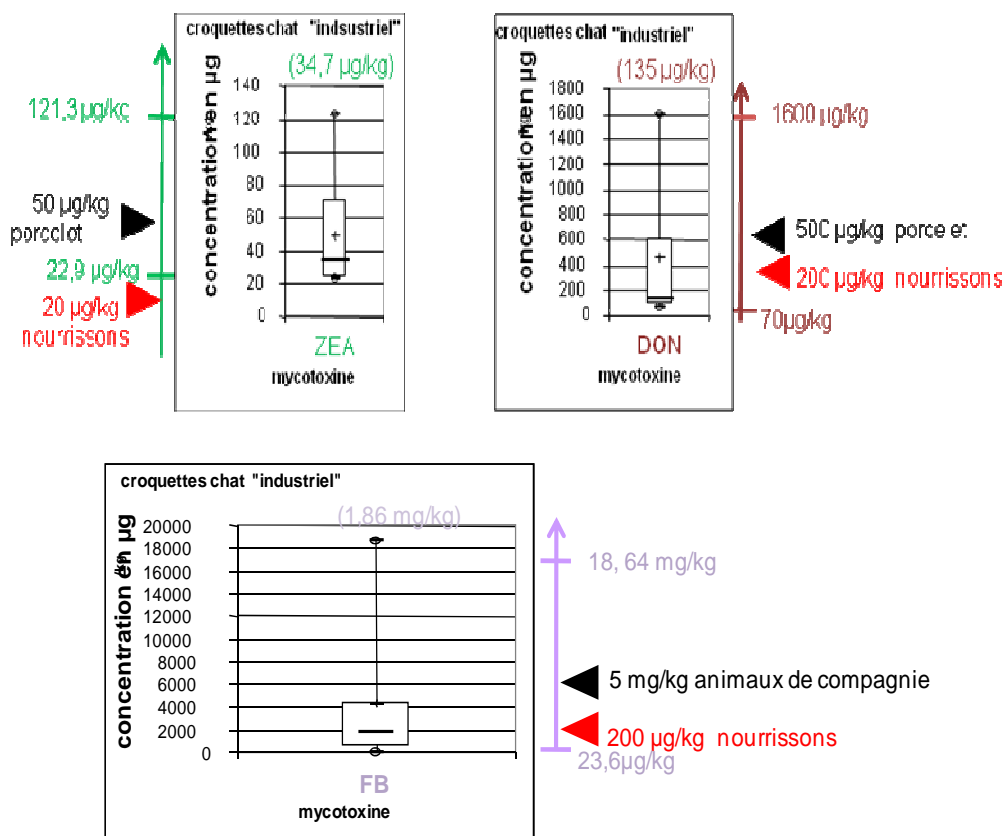


Figure 85 : Répartition des taux de ZEA, de DON et de FB dans les croquettes de chat provenant d'industriel

#### 2.1.2.1 Comparaison aux recommandations animales

Six des sept échantillons (85,7%) analysés contiennent de la ZEA. Deux échantillons (Aliment A et B) dépassent la limite autorisée en ZEA pour les porcelets (50µg/kg).

Tous les échantillons analysés (100%) contiennent de la FB<sub>1</sub>. Deux échantillons (A et 112/10) dépassent la limite autorisée en alimentation des animaux de compagnie (5mg/kg). L'échantillon A dépasse de 3,5 fois la valeur réglementaire.

Tous les échantillons contiennent du DON. Deux échantillons (11%) dépassent la limite autorisée du DON en alimentation animale pour les porcelets estimée à 500µg/kg (760 µg/kg et 1,6mg/kg).

La totalité des échantillons analysés (100 %) sont contaminés en OTA mais aucun ne dépasse la limite recommandée. La CIT est présente dans tous les échantillons analysés.

L'AFB<sub>1</sub> a été détectée dans deux échantillons (28,5%). Ils ne dépassent aucune législation.

#### 2.1.2.2 Comparaison à la législation humaine

Tous les échantillons positifs en ZEA (6/7 échantillons : 85,7%) présentent une contamination en ZEA dépassant largement (jusqu'à six fois) la limite autorisée pour l'alimentation (à base de maïs ou de céréales) des nourrissons et enfant en bas âge fixée à 20 µg/kg.

Six échantillons sur les sept (85,7%) analysés présentent des taux de FB<sub>1</sub> dépassant la réglementation pour les préparations à base de maïs et aliments pour bébé destinés aux nourrissons et enfants en bas âge (200 µg/kg).

Trois échantillons (A, B et 252/10) contiennent des taux de DON dépassant de 1,3 à 8 fois la limite autorisée chez les nourrissons (200µg/kg).

Deux échantillons dépassent la limite autorisée en OTA (4,53 et 1,98µg/kg) dans les préparations à base de céréales et aliments destinés aux nourrissons et enfants en bas âge (0,5 µg/kg).



## 2.2 Croquettes de chien

Des problèmes semblables à ceux observés dans les élevages de chat, mortalité des chiots, avortements, nouveau-nés anormaux, infertilité ont aussi été observés. De nombreuses analyses (bactériologie, sérologie, analyse des selles, de poils, ....) réalisées sur les mères ou sur les chiots n'ont rien donné. En revanche, l'autopsie et l'histologie de certains chiens a révélé une intoxication alimentaire. Après avoir écarté l'hypothèse d'un empoisonnement par l'eau, la contamination des croquettes par les mycotoxines a été émise car ces croquettes contiennent des céréales. Dans certains élevages, les problèmes de santé ont disparu dès que l'alimentation des chiens a été changée.

### 2.2.1 Provenant de plusieurs élevages de chiens

Dix échantillons de croquettes de chien provenant d'élevage, de marques différentes ont été analysés. Les mycotoxines de champ (FB, ZEA, DON) et les mycotoxines de stockage (OTA, CIT, AFB) ont été recherchées. Des croquettes de chien (1 à 4) ont été analysées à la demande d'un éleveur chez lequel les animaux ont des problèmes de santé suite à leur utilisation (tableau 39). D'autres croquettes (5-10) de marques différentes ont été analysées à la demande du même éleveur afin de choisir la meilleure croquette (tableau 40).

Tableau 39 : Analyse des croquettes de chien provenant d'éleveur effectué en sous-traitance.

Echantillon		Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>				Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>			
Nom	Marque	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	FB <sub>2</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Autres AFB
1	Biomil adult medium	195	800	220 (FB=1020)	485	1	NA	NA	NA
2	Nutram gold adult	105	2400	650 (FB=3050)	65	<LOD	<LOD	2	NA
3	Belcando Multicroc	45	105	15 (FB=120)	120	1	NA	NA	NA
4	Royal canin anoestrus	35	1360	170 (FB=1530)	155	NA	NA	NA	NA

(NA: non analysé, ND<LOD, LOD ZEA=10 µg/kg ; LOD DON=20µg/kg ; LOD OTA=0,5mg/kg ; LOD AF= 1mg/kg ; LOD FB= 10 µg/kg).

Tableau 40 : Analyse des croquettes de chien provenant d'éleveur effectué au sein de notre laboratoire

Echantillon		Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>				Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>			
Nom	Marque	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	FB <sub>2</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Autres AFB
5	Eukanuba adult maintenance small	46,2	19,35	1,94 (FB=21,29)	286,6	1,54	0,093	0,45	G2, G1, B2
6	Royal canin spécial York	34,10	8,98	7,44 (FB=16,42)	255,3	0,53	0,44	0,60	G2, G1, B2
7	Pet's planet maintenance	8,12	437,73	91,88 (FB=529,61)	88,1	0,12	0,17	0,71	G2, G1, B2
8	Proplan adult	12,39	99,18	81,05 (FB=180,23)	300,2	1,12	0,38	0,63	G2, G1, B2
9	Purina Dog chow complet	40,66	2,05	8,06 (FB=10,11)	650,8	ND	1,13	0,40	G2, G1, B2
10	Purina excellent junior 15 Kg	55,95	77,73	80,60 (FB=158,33)	306,7	0,12	0,51	0,37	G2, G1, B2

(N.A : non analysé, ND: non détectable, ND<LOD) (LOD ZEA=0,5µg/kg, LOD FB=3µg/kg ; LOD OTA=0,03µg/kg ; LOD CIT=0,1 µg/kg, LOD AF=0,02µg/kg; LOQ DON=40µg/kg).

Les mycotoxines dites « de champ » (ZEA, FB et DON) ont été retrouvées à des concentrations très importantes, atteignant plusieurs centaines de microgrammes pour le DON et la ZEA et des milligrammes pour les FB.

Tous les échantillons présentent des co-contaminations de plusieurs mycotoxines (au moins trois) (figure 86). La contamination en CIT s'est avérée la moins importante en terme de concentration, suivie de l'AFB<sub>1</sub> et de l'OTA.

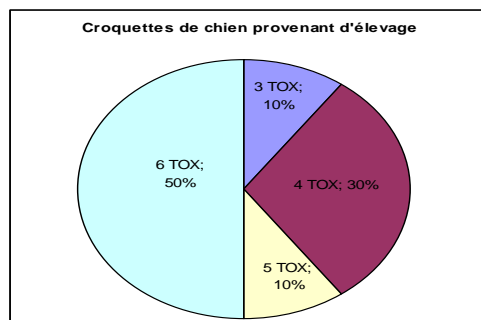


Figure 86 : Appréciation globale des co-contaminations dans les aliments de chien provenant d'élevage

Nous avons comparé les valeurs de mycotoxines obtenues, aux recommandations animales et à la réglementation pour nourrissons et enfants en bas-âge (figure 87 et 88).

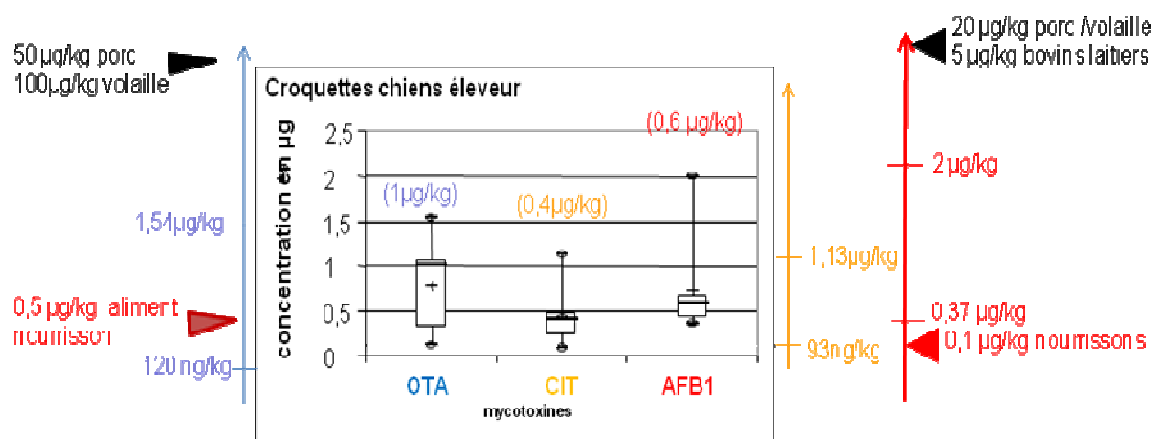


Figure 87 : Répartition des taux d'OTA, CIT et AFB<sub>1</sub> dans les croquettes de chien provenant d'élevage

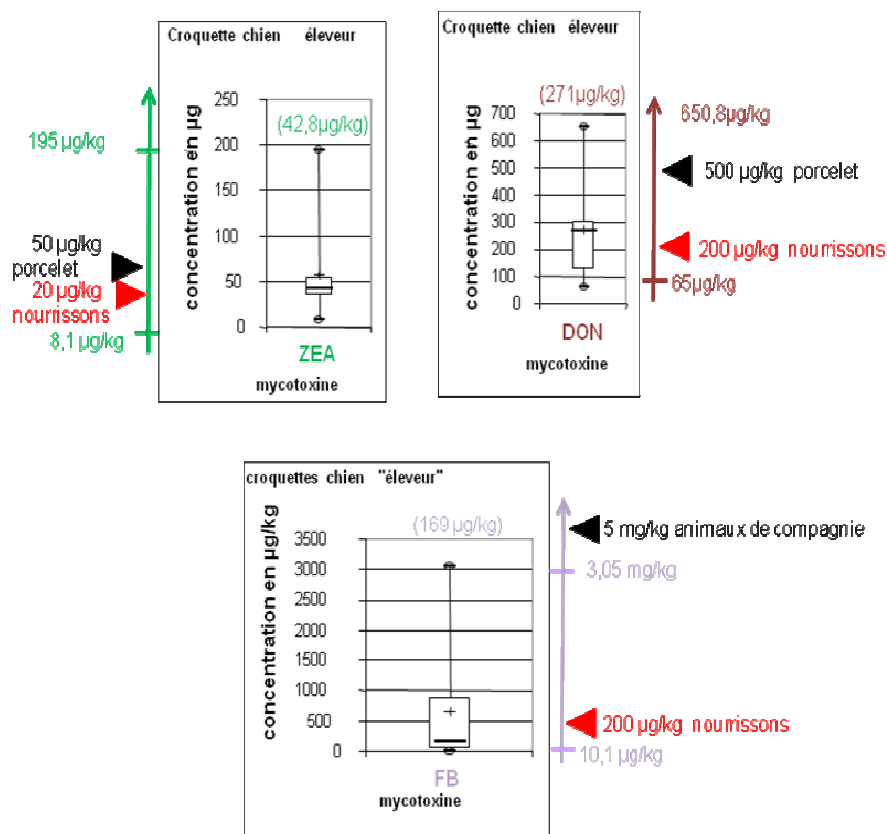


Figure 88 : Répartition des taux de ZEA, FB et DON dans les croquettes de chien provenant d'éleveur

#### 2.2.1.1 Comparaison aux recommandations animales

La ZEA est présente dans toutes les croquettes analysées. Trois échantillons dépassent la limite autorisée en ZEA ( $50\mu\text{g/kg}$ ) chez les animaux (porc) avec des taux de  $55,95\mu\text{g/kg}$ ,  $105\mu\text{g/kg}$  et  $195\mu\text{g/kg}$ .

Les FBs sont retrouvées dans la totalité des échantillons et se situent entre  $10,11\mu\text{g/kg}$  et  $3,05\text{mg/kg}$ . Ces concentrations sont considérées comme assez importantes même si elles ne dépassent pas la valeur recommandée pour animaux domestiques ( $5\text{mg/kg}$ ).

Tous les échantillons sont contaminés par le DON. Un échantillon (5) dépasse la limite recommandée en alimentation animale ( $500\mu\text{g/kg}$  pour le porc).

La contamination en OTA dans les croquettes de chien est présente dans 7/10 échantillons. Aucun échantillon ne dépasse la valeur d'OTA recommandée en alimentation animale estimée à  $50\mu\text{g/kg}$  pour les porcs.

Dans certains échantillons, d'autres aflatoxines ont été détectées en plus de l' $\text{AFB}_1$ , à savoir l'aflatoxine  $\text{B}_2$ ,  $\text{G}_1$  et  $\text{G}_2$  à des taux non négligeables, mais elles n'ont pas été quantifiées. Comme pour les croquettes de chats, aucun échantillon de cette catégorie ne dépasse la limite autorisée (Directive 2002 32/CE du 07 05 02) en Europe en aflatoxines pour l'alimentation animale.

#### 2.2.1.2 Comparaison à la législation humaine

On a constaté des dépassements des teneurs maximales autorisées si on se réfère aux normes pour l'alimentation humaine pour nourrissons.

Huit échantillons sur dix (80%) analysés sont 1,5 à 9,5 fois supérieurs aux teneurs limites en ZEA pour l'alimentation (à base de maïs ou de céréales) des nourrissons et enfants en bas âge fixée à  $20\mu\text{g/kg}$ .

Quatre échantillons (40%) contiennent une quantité en FB supérieure de 2,5 à 15 fois la limite autorisée en fumonisines pour les préparations (à base de maïs) destinés aux nourrissons et enfants en bas âge (200 µg/kg).

Le taux réglementaire en DON (200µg/kg) dans l'alimentation des nourrissons a été dépassé dans six échantillons (60%) jusqu'à un facteur trois.

Quatre échantillons dépassent la limite autorisée en OTA (1,54, 0,53 et 1,12 et 1µg/kg) dans les préparations à base de céréales et aliments bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge (0,5 µg/kg).

Tous les échantillons de croquettes de chien dépassaient la limite autorisée en AFB<sub>1</sub> pour les aliments pour nourrissons (0,1µg/kg).

### 2.2.1.3 Corrélations ingrédients/mycotoxines

Les croquettes pour chien sont constituées d'ingrédients d'origine végétale (céréales, légumes, etc.) et d'origine animale (poulet, dinde, graisse animale, etc) (voir tableau ingrédient en annexe 5). Les céréales entrent en grande partie dans la formulation des croquettes de chien. Tous les échantillons contiennent au moins une céréale.

La plus grande concentration en FB (3,05mg/kg) a été retrouvée dans l'échantillon 2 (Nutram adulte Gold poulet et riz). Ce dernier ne contient pas de maïs, il est constitué de riz et de lin seulement. Dans les échantillons (5 et 6) (Eukanuba adult maintenance small et Royal canin Spécial York), bien que le maïs fasse partie des ingrédients majeurs de ces deux croquettes, la teneur en FB reste parmi les plus faibles (21,29 et 16,42µg/kg respectivement). Cela indique que la contamination en FB n'est pas seulement corrélée à la présence de maïs mais que le maïs est mieux contrôlé que les autres ingrédients.

L'aliment 2 (Nutram adulte Gold poulet et riz) contient la plus grande concentration en AFB<sub>1</sub> (2µg/kg) qui pourrait provenir du riz. En effet, l'AFB<sub>1</sub> a été retrouvée dans des échantillons de riz vietnamiens. Certains échantillons dépassaient la limite autorisée en Europe pour l'OTA (3µg/kg) et/ou en AFB<sub>1</sub> (4µg/kg) (Nguyen *et al.*, 2007).

Les résultats de l'aliment 10 « Purina excellent », qui correspond à une croquette milieu de gamme chez Proplan, sont assez catastrophiques sur les chiens : problème de peau, chien de mauvaise santé physique et mentale, portée peu nombreuses, et fort taux de mortalité. Ces problèmes sont sans doute dus aux taux élevés en FB (158,33µg/kg), en DON (306,7µg/kg) et en ZEA (55,95µg/kg). Cet aliment est composé de plusieurs céréales (riz, blé, maïs et gluten de maïs). Il est difficile de savoir quel ingrédient est responsable sachant que le maïs à lui seul peut être source de contamination par plusieurs mycotoxines notamment la FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, ZEA et OTA (Domijan *et al.*, 2005)

L'aliment 8 « Proplan adult » donne des résultats assez satisfaisants, les chiens nourris avec cette croquette retrouvent des portées plus nombreuses, cela est peut être du au taux faible en ZEA (12,39µg/kg).

La croquette 9 « Purina dog chow complet » contient la plus faible concentration en FB et la plus grande concentration en DON. Il n'y a pas de corrélation entre la présence des FB, du DON et de la ZEA bien qu'elles soient produites par des *Fusaria*.

La présence de CIT et d'AFB<sub>1</sub> est souvent associée à l'OTA. Dans ces échantillons plusieurs céréales rentrent dans la formulation du produit. Ces mycotoxines peuvent être produites par le même genre de champignon.

## 2.2.2 **Provenant du commerce**

Nous avons analysé des croquettes de chien de diverses marques et de diverses enseignes commerciales à la demande de l'institut national de consommation (INC).

Trente échantillons de croquettes pour chien ont été analysés pour leur contenance en AFB, OTA, CIT, ZEA, FB<sub>1</sub>, DON, toxines T2 et HT2. Nous avons analysé 10 croquettes pour chien adulte (11-20) ; 7 croquettes pour chien senior > 8 ans (21-27) ; 8 croquettes 'light' (28-35) et 5 croquettes pour chiot (36-40). Les concentrations en mycotoxines sont exprimées en µg/kg d'aliment. Les résultats sont présentés dans le tableau 41 ci-dessous.

Tableau 41 : Analyse des croquettes de chien provenant du commerce

Echantillons		Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>					Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>		
nom	Marque	ZEA	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	DON	HT <sub>2</sub>	OTA	CIT	AFB <sub>1</sub>
11	Intermarché (<10kg) Canaillou oligo actifs	41,5	141		199		2,4	1,01	ND
12	Purina (Nestlé) FIDO tendres bouchées	7,5	83		102		0,54	0,08	ND
13	Affinity patcare (France) Spécial mini Ultima adult	17,2	504		96	11	0,23	0,22	0,21
14	Hill's (mini chien) Healthy Mobility	8,1	9		81		0,09	0,11	ND
15	Marque repère (<10kg) Lydog	1,9	3		351		0,09	0,33	ND
16	Affinity petcare (France) Brekies excel multicroc volaille	9,9	ND		338		0,66	0,17	ND
17	Purina (Nestlé) Friskies life plus nutrition	ND	58		68		0,14	0,34	0,125
18	Virbac VET COMPLEX	22	448		50		0,05	0,15	0,06
19	ED (Dia) Croquettes aux viandes	0,9	57		399		2,67	0,58	ND
20	Casino Les Fines Croquettes	15,5	13,7		335	14	0,28	0,38	ND
21	Pedigree forme et vitalité senior 8+ petit chien	4,1	ND		124		0,08	ND	ND
22	Affinity petcare (France) Spécial mini Ultima senior riche en poulet et riz	5,8	133		72		0,27	0,06	ND
23	Royal canin Mini mature 27	2,8	ND		51		0,21	ND	ND
24	Nutrivia senior au poulet et au riz	2,8	ND		69		ND	ND	ND
25	Hill's Active Longevity mature Adult 7+	0,85	ND		142		ND	ND	ND
26	PurinaPro plan senior original +7	7,3	ND		122		0,52	0,51	ND
27	Leader price Croquettes senior	12,2	538	110 (FB=648)	215		4,53	ND	ND
28	Marque repère Lydog allégées	3,5	ND		207		0,1	0,79	ND
29	Intermarché Canaillou light	4,7	29,8		249		0,4	1,11	ND
30	Purina Friskies life plus nutrition light	2,3	ND		71		0,57	0,41	0,1
31	Pedigree contrôle du poids	6,8	ND		94		0,21	0,35	ND
32	Hill's Light	13,3	121	123 (FB=244)	67		ND	ND	ND
33	Nutrivia allégé au poulet et aux haricots verts	30	57		128		1,73	0,59	0,11
34	Virbac VET COMPLEX light	16,6	236		125		0,09	0,37	ND
35	Royal canin Mini light 30	6	659		145		0,31	0,05	ND
36	Carrefour Junior nutricroc	11,3	ND		292		0,35	0,93	ND
37	Nutrivia chiot au poulet et au riz	ND	ND		80		0,16	ND	ND
38	Hill's Healthy Development	6,4	103		63		0,04	0,07	ND
39	Pedigree Chiot petit et moyens chiens, croissance et protection	4,8	ND		20		0,117	0,1	ND
40	Leader price Croquettes junior	20	112		235		2,5	ND	0,03
<b>Pré vale nce</b>		<b>28/30</b>	<b>18/30</b>	<b>2/30</b>	<b>30/30</b>		<b>27/30</b>	<b>22/30</b>	<b>6/30</b>

(N.A : non analysé, ND: non détectable, ND<LOD) (LOD ZEA=0,5µg/kg, LOD FB=3µg/kg ; LOD OTA=0,03µg/kg ; LOD CIT =0,1 µg/kg, LOD AF=0,02µg/kg; LOQ DON=40µg/kg, LOQ HT2=50µg/kg).

Quel que soit l'échantillon, il y a au minimum deux mycotoxines. Certains échantillons renferment les sept groupes de mycotoxines analysées (figure 89).

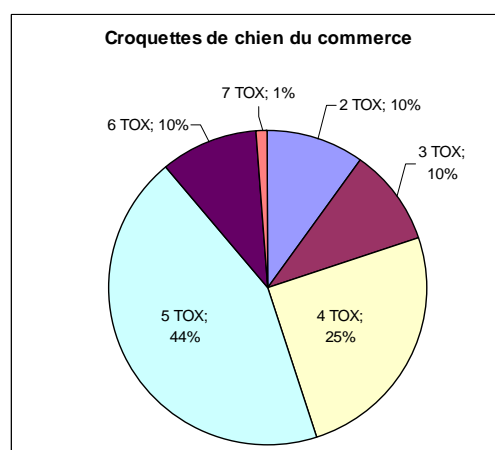


Figure 89 : Appréciation globale des co-contaminations dans les aliments de chien provenant du commerce

Vingt huit échantillons sur 30 (93%) contiennent de la ZEA. Il n'y a que deux échantillons (17 & 37) qui ne contiennent pas de ZEA.

Les fumonisines sont présentes dans 18/30 échantillons analysés (60%). La totalité des croquettes contiennent du DON.

Seulement trois échantillons (24, 25, 32) ne contiennent pas d'OTA. La CIT coexiste systématiquement avec l'OTA. Comme cette toxine synergise celle de l'OTA sa présence augmente le risque. Cette dernière est présente dans 22 échantillons. L'AF est peu fréquente, mais est malgré tout retrouvée dans 6 échantillons (13,17, 18, 30, 33, 40). Elle est associée à l'OTA et la CIT.

Nous avons comparé nos résultats d'une part à la réglementation animale et d'autre part la législation pour nourrissons (figure 90 et 91).

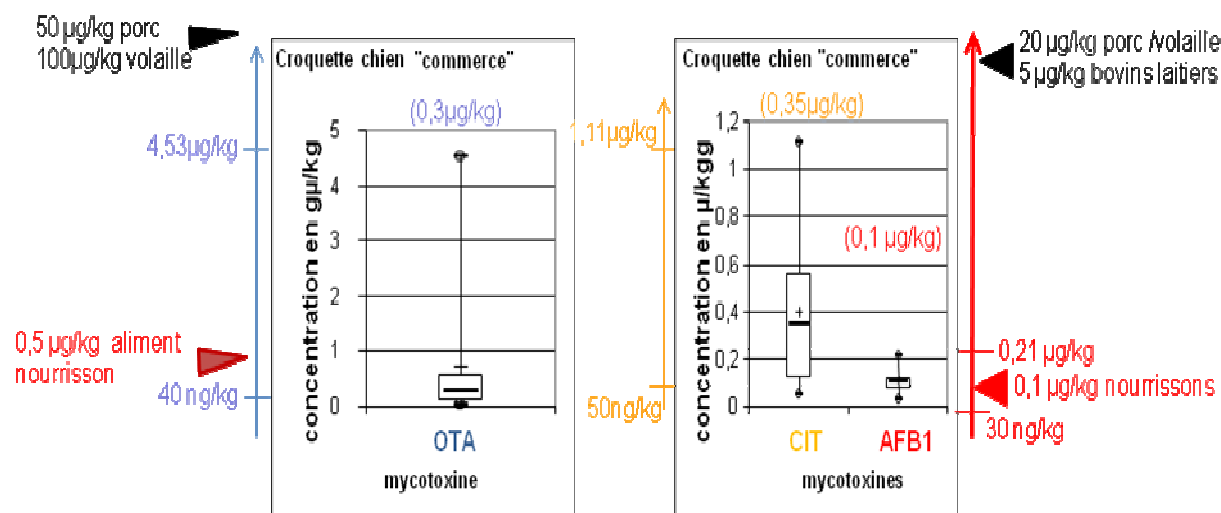


Figure 90 : Répartition des taux d'OTA, CIT et AFB<sub>1</sub> dans les croquettes de chien provenant du commerce

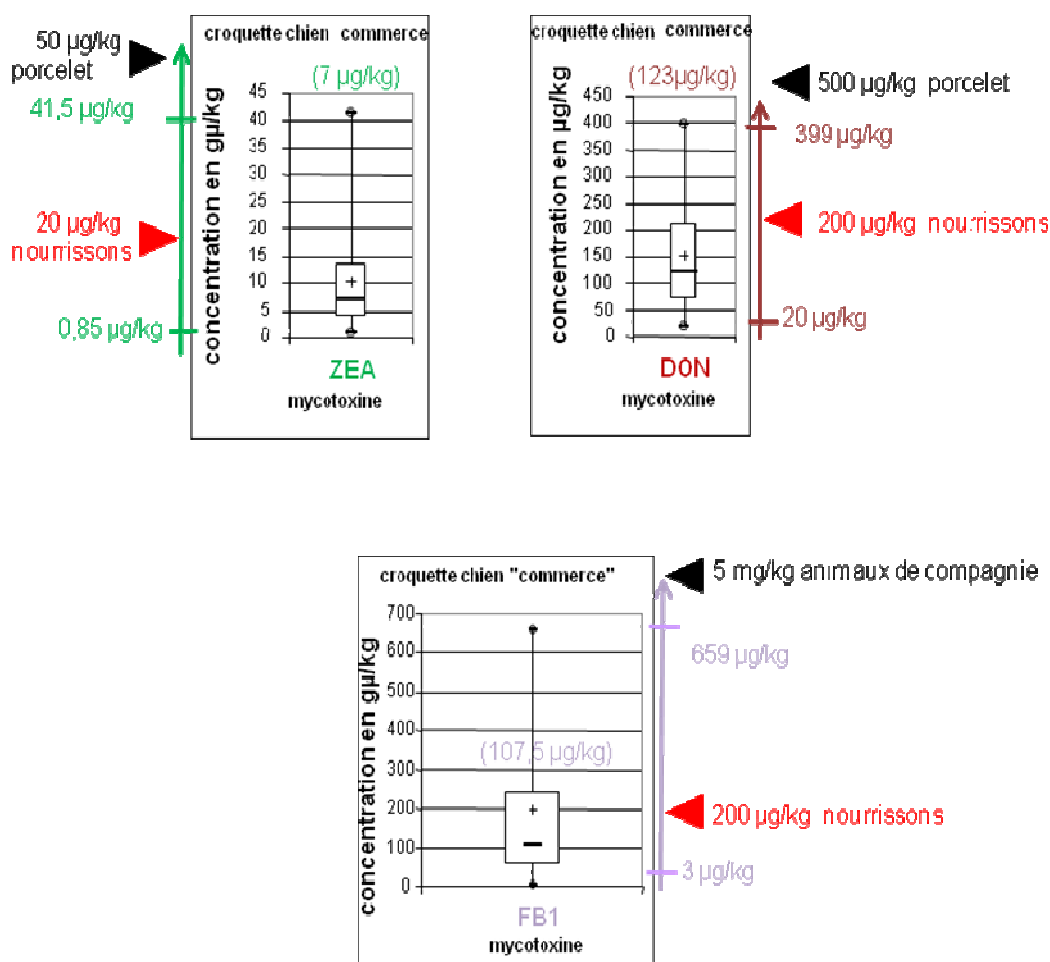


Figure 91 : Répartition des taux de ZEA, FB et DON dans les croquettes de chien provenant du commerce

#### 2.2.2.1 Comparaison aux recommandations animales

La limite réglementaire dans l'alimentation animale en AFB<sub>1</sub> (20 µg/kg) n'est pas dépassée. Aucun échantillon ne dépasse les limites recommandées dans l'alimentation animale que ce soit pour la ZEA (50 µg/kg), l'OTA (50 µg/kg), les FB (5 mg/kg) et le DON (500 µg/kg).

#### 2.2.2.2 Comparaison à la législation humaine

Quatre échantillons (11 ; 18 ; 33 ; 40) contiennent de la ZEA à des taux égal ou supérieur (jusqu'à 2 fois) à la limite autorisée chez les nourrissons estimée à 20 µg/kg.

La limite réglementaire en FBs (200 µg/kg) dans l'alimentation des nourrissons est dépassée (jusqu'à plus de 3 fois) dans 6 échantillons (13 ; 18 ; 27 ; 32 ; 34 ; 35).

Dix échantillons (11 ; 15 ; 16 ; 19 ; 20 ; 28 ; 29 ; 36 ; 40) contiennent du DON à des taux supérieurs (jusqu'à 2 fois) ou égaux à la valeur réglementaire (200 µg/kg).

Neuf échantillons (33%) (11 ; 12 ; 16 ; 19 ; 26 ; 27 ; 30 ; 33 et 40) présentent un taux d'OTA dépassant la limite autorisée chez les nourrissons (0,5 µg/kg). Dans certains échantillons la limite est dépassée de 5 et de 9 fois. Cette comparaison avec la réglementation des nourrissons est d'autant plus judicieuse car le chien est l'animal le plus sensible à l'effet néphrotoxique de l'OTA. La dose létale (DL<sub>50</sub>) après administration d'OTA par voie orale est égale à 0,2 mg/kg pc chez le chien contre 1 mg/kg pc chez le porc (Pfohl-Leszkowicz, 1999 dans le chapitre OTA).

Bien que l'AFB<sub>1</sub> soit peu présente, les taux en comparaison à l'alimentation pour nourrissons sont parfois trop élevés : un échantillon (13) contient (0,2 µg/kg) le double de ce qui est autorisé (0,1 µg/kg) et 3 échantillons (17 ; 30 ; 33) contiennent de l'AFB<sub>1</sub> à un taux égal ou légèrement supérieur (0,125 µg/kg) à la limite autorisée (0,1 µg/kg).

### 2.2.2.3 Classification des 30 échantillons

Pour classer les échantillons, nous avons pris en compte non seulement le taux de mycotoxines mais également leur présence simultanément. Pour cela nous avons affecté un facteur reflétant le taux de contamination en mycotoxines, en appliquant une stratification liée aux normes (adulte/bébé et porc). Puis nous avons multiplié entre eux ces coefficients. Ceci permet une meilleure discrimination que si nous faisons une somme, puisque la combinaison de plusieurs facteurs de risque a un effet plus qu'additif. On note très souvent des synergies. Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, dans nos études toxicologiques nous avons même montré que des effets toxiques apparaissaient lorsqu'il y avait deux toxines simultanément à des doses auxquelles elles n'engendrent aucun effet quand elles sont seules. Les meilleures croquettes sont celles dont le résultat est le plus faible.

Il n'existe pas de réglementation vis-à-vis des mycotoxines dans l'alimentation animale, sauf pour l'AFB<sub>1</sub> pour les animaux de rente. Le taux maximal autorisé pour l'AFB<sub>1</sub> dans l'aliment pour porc est 20µg/kg. Pour les autres mycotoxines seules des recommandations existent pour les animaux de rente, sauf pour la FB pour laquelle la recommandation vise aussi les animaux familiers. Le chien étant plus sensible, et de poids moindre que le porc, le maximum autorisé pour le porc est déjà excessif pour un chien. Néanmoins notre classification prend en compte la recommandation pour porc ; la législation pour nourriture humaine ; la nourriture pour bébé. Les coefficients ont été affectés de la manière suivante (tableau 42). Le tableau 43 ci-dessous indique la cotation mycotoxine par mycotoxine de chaque échantillon.

Tableau 42 : Coefficient de gravité

coefficient	1 (TB)	2 (B)	3 (acceptable)	4 (insuffisant)	5 (très insuffisant)
OTA	ND-0,09 µg/kg	0,1-0,5 µg/kg	0,5-3 µg/kg	>5 µg/kg	> 50 µg/kg
AF	ND-0,03 µg/kg	0,03-0,1 µg/kg	0,1-2 µg/kg	2-20 µg/kg	>20 µg/kg
ZEA	ND-2 µg/kg	2-10 µg/kg	10-20 µg/kg	20-50 µg/kg	>50 µg/kg
FB	ND-5 µg/kg	5-200 µg/kg	>200 µg/kg	>800 µg/kg	>5000 µg/kg
DON	ND-50 µg/kg	50-120 µg/kg	120-200 µg/kg	>200 µg/kg	>500 µg/kg
CIT	ND-0,2 µg/kg	>0,2 µg/kg	>3 µg/kg	>5 µg/kg	>100 µg/kg

Tableau 43 : Cotation et classement des croquettes en fonction des contaminations en mycotoxines

N° échantillon	OTA	CIT	AF	ZEA	FB	DON	HT2	Cotation finale	Classement
11	3	2	1	4	2	3	1	144	25
12	2	1	1	2	2	2	1	16	10 [14*]
13	2	2	2	3	3	2	2	288	29 [30*]
14	1	2	1	2	1	2	1	8	7 [8*]
15	1	2	1	1	1	4	1	8	7 [9*]
16	3	2	1	2	1	4	1	48	19
17	2	2	3	1	2	2	1	48	19 [20*]
18	1	1	2	4	3	1	1	24	16
19	3	2	1	1	2	4	1	48	19 [22*]
20	2	2	1	3	2	4	2	192	26
21	1	1	1	2	1	2	1	4	3 [5*]
22	2	1	1	2	2	2	1	16	10 [13]
23	2	1	1	2	1	1	1	4	3 [4*]
24	1	1	1	2	1	1	1	2	1
25	1	1	1	1	1	2	1	2	1
26	2	2	1	2	1	2	1	16	10 [12*]
27	4	1	1	3	4 (+1 FB2)	4	1	240	28
28	1	2	1	2	1	4	1	16	10 [11*]
29	2	2	1	2	2	4	1	64	24
30	3	2	2	1	1	2	1	24	16 [17*]
31	2	2	1	2	1	2	1	16	10
32	1	1	1	3	2 (+1 FB2)	2	1	18	15
33	3	2	3	4	2	2	1	288	29
34	1	2	1	3	3	2	1	36	18
35	2	1	1	2	4	3	1	48	19 [23*]
36	2	2	1	3	1	4	1	48	19 [21*]
37	2	1	1	1	1	2	1	4	3
38	1	1	1	2	2	2	1	8	7
39	2	1	1	2	1	1	1	4	3 [6*]
40	3	1	2	4	2	4	1	192	26 [27]

\*La valeur entre crochets est le classement définitif en prenant en compte le nombre de mycotoxines et l'usage éventuel de la croquette (voir ci-dessous)



#### 2.2.2.4 Conclusion sur la classification des croquettes pour l'INC

La qualité des croquettes 'senior' est incontestablement supérieure aux autres catégories. La marque Nutrivia est capable du meilleur (senior & chiot) comme du pire (allégé). Leader Price propose des croquettes de très mauvaise qualité sanitaire. Pedigree quelle que soit la catégorie est de bonne qualité.

#### 2.2.2.5 Corrélation ingrédients /mycotoxines

Le fait que plusieurs céréales rentrent dans la formulation d'un aliment, ne signifie pas forcément une plus grande concentration en mycotoxine. Dans certains échantillons (24 et 25 et 37), plusieurs céréales font partie de leur composition comme le maïs, le riz et le blé néanmoins la contamination en mycotoxine reste raisonnable. La FB, l'OTA, CIT et l'AFB<sub>1</sub> ne sont pas détectés dans les croquettes 24 et 25 et le taux de ZEA est faible (2,8 et 0,85 µg/kg). Dans la croquette 37, seuls l'OTA (0,16 µg/kg) et le DON (80 µg/kg) ont été retrouvés.

Dans certains échantillons (21 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 31 ; 37 et 39) malgré la présence de maïs, les FB n'ont pas été détectées, cependant une quantité importante de DON a été retrouvée dans ces échantillons. Le soja rentre dans la formulation de six échantillons (14 ; 18 ; 23 ; 32 ; 34 et 35). Dans certains d'entre eux (18 ; 32 ; 34 et 35), il a été retrouvé des quantités importantes en FB (448 ; 244 ; 236 et 659 µg/kg).

Dans les croquettes contenant les sous produits d'origine végétale (11 ; 17 ; 20 ; 27 ; 29 ; 36 et 40), toutes les mycotoxines ont été retrouvées à des quantités importantes dépassant les limites autorisées chez les nourrissons. Comme pour les croquettes de chat, la croquette de chien contenant le plus de FB (3mg/kg) est constitué de riz et de betterave.

### 2.3 Discussions sur les croquettes de chat et de chien

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude de la contamination de l'alimentation animale par les mycotoxines suite à des décès brusques d'animaux ou à des problèmes de santé. Il apparaissait des signes de contamination par les mycotoxines.

D'après les fabricants de croquettes tous les composants sont au standard de qualité des aliments humains (cf article de 60M de consommateur n° 426, Avril 2008). Ceci est manifestement faux puisque des mycotoxines ont été retrouvées en combinaison dans tous les échantillons analysés. Dans certains échantillons les teneurs maximales autorisées en alimentation humaine et/ou animale ont été dépassées.

Il est connu que ce qui est rejeté pour l'alimentation humaine est redirigé vers l'alimentation animale puisqu'à l'heure actuelle seule des recommandations existent pour les mycotoxines dans les nourritures animales à l'exception de l'AFB<sub>1</sub> qui est la seule réglementée pour l'alimentation des animaux de la ferme. Il conviendrait d'établir des seuils pour animaux familiers (chat et chien) comme ceux établis pour les nourrissons, en prenant en compte leur durée de vie, leur taille, leur métabolisme et le fait qu'ils sont nourris par le même aliment durant toute leur vie.

Les taux d'OTA retrouvés peuvent s'avérer dangereux pour un chien, qui est l'animal le plus sensible à l'effet néphrotoxique de l'OTA. Il est 10 à 100 fois plus sensible à l'OTA que le porc (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Ceci est dû au fait qu'il manque au chien une enzyme de détoxification permettant la formation d'acide mercapturique. Les dérivés glutathions conjugués formés dans le foie sont dirigés vers le rein au niveau duquel ils sont transformés en dérivés cystéine conjugués. Ce dernier dérivé est chez la plupart des animaux acétylé en dérivé mercapturique (voir figure 19 partie bibliographique 2). Le chien ne possède pas cette acétylase (N-acétyl transférase) (Watkins & Klaassen, 1986). Le dérivé cystéinyl-OTA ne peut plus s'éliminer et s'accumule dans le rein. Le seuil d'OTA de 50 µg/kg d'aliment préconisé pour le porc n'est vraisemblablement pas suffisant pour protéger le chien.

La ZEA a été retrouvée dans presque tous les échantillons analysés à des concentrations très élevées. Cette toxine est très problématique pour la reproduction et la croissance des jeunes animaux. Vis-à-vis de cette mycotoxine c'est le chat qui est particulièrement sensible car il est dépourvu d'enzymes de glucurono-conjugaison (Watkins & Klaassen, 1986). Cette voie de conjugaison est fortement impliquée dans le métabolisme de la ZEA. L'absence de conjugaison à l'acide glucuronique

perturbe son élimination et favorise de ce fait son accumulation dans les organes génitaux. Cette mycotoxine a des propriétés œstrogéniques (Zinedine *et al.*, 2007).

### 2.3.1 OTA

Les concentrations d'OTA mesurées dans les croquettes dans notre étude varient entre 40ng/kg et 4,53µg/kg (médiane=0,3µg/kg) pour les croquettes de chien et entre 44ng/kg et 1,24µg/kg (médiane= 0,15 µg/kg) pour les croquettes de chat. Ces résultats sont comparables à ceux de Martins *et al.* en 2003, qui ont analysés 60 échantillons (20 pour chien, 20 pour chat et 20 pour des oiseaux). L'OTA, la FB<sub>1</sub> et le DON ont été détectés uniquement dans les aliments pour chiens. Le taux d'OTA mesuré dans 5/20 aliments de chien analysés était entre 2 et 3,6 µg/kg.

L'équipe de Puhlinger (2003) a analysé dix aliments pour chien (deux aliments secs et dix en conserve) et 28 aliments pour chat (huit aliments secs et 20 en conserve). L'OTA a été retrouvée dans 47% des échantillons analysés. Les taux d'OTA retrouvés vont de 0,21 à 3,2 µg/kg dans les aliments secs et de 0,22 à 0,8 µg/kg dans les aliments en conserve.

Une autre étude a été consacrée à la recherche de l'OTA dans 55 échantillons d'aliments de chat (10 aliments secs et 45 en conserve). L'OTA a été retrouvée dans sept échantillons secs et sept échantillons en conserve à des concentrations de 0,11 à 2,17 µg/kg (Gareis *et al.*, 1987).

### 2.3.2 CIT

La citrinine n'est pas souvent recherchée. Cette toxine est souvent associée à l'OTA et a pour propriété d'augmenter la toxicité de l'OTA (thèse Molinié, 2004, Speijers *et al.*, 2004 ; Peraica *et al.*, 2008). Dans notre étude, son taux varie entre 50ng/kg et 1,13µg/kg (médiane=0,36µg/kg) dans les aliments pour chien et entre 0,13µg/kg et 1,24µg/kg (médiane=0,74 µg/kg) dans les croquettes de chat. Dans l'étude de Little *et al.* (1991), un échantillon d'aliment pour chien ayant eu une pathologie hépatique a été analysé. L'OTA a été retrouvée à un taux de 100µg/kg associée à 200µg/kg de CIT et 200µg/kg de stérigmatocystine.

### 2.3.3 AFB<sub>1</sub>

Les taux d'AFB<sub>1</sub> dans notre étude se situent entre 0,03µg/kg et 2µg/kg (médiane=0,37µg/kg) dans les croquettes de chien, et entre 27,4 ng/kg et 1,87µg/kg (médiane= 1,12µg/kg) dans les croquettes de chat. Les concentrations sont 50 à 100 fois plus faibles que celles mesurées par d'autres auteurs. Garland *et al.* (2001) ont trouvé de 100 à 300 µg d'AFB<sub>1</sub>/kg d'aliment dans des aliments pour chiens décédés de toxicité aigue ou chronique. Maia *et al.* (2002) ont analysé 100 aliments pour animaux, dont 45 pour chiens, 25 pour chats et 30 pour oiseaux. L'AFB<sub>1</sub> a été retrouvée respectivement dans 6,7 %, 4% et 26,7% des aliments pour chiens, chats et oiseaux. Le taux d'AFB<sub>1</sub> était en moyenne de 19µg/kg dans les aliments pour chiens, de 16µg/kg dans des aliments pour chats et de 110µg/kg dans les aliments pour oiseaux. La concentration des aflatoxines totales était de 15 à 374 µg/kg.

Sharma et Marquez (2001) ont analysé différentes aflatoxines dans 35 échantillons d'aliment pour chats et chiens provenant de douze marques commerciales mexicaines différentes. La présence de sept aflatoxines (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, P<sub>1</sub> et aflatoxicol) (voir métabolisme des aflatoxines dans la partie bibliographique 1) a été observée dans la plupart des échantillons. L'AFB<sub>1</sub> est la plus rencontrée à des taux élevés dans six échantillons (17%). Les concentrations les plus élevées en aflatoxines sont 72,4 et 59,7 ng/kg. En comparaison avec d'autres études, ces concentrations sont nettement plus faibles.

Gunsen et Yaroglu (2002) ont analysé 18 échantillons pour leur présence en AFB<sub>1</sub>. La prévalence était de 16,7%. Le taux d'AFB<sub>1</sub> se situait entre 1,75 et 20µg/kg.

Beaucoup d'études ont été et sont toujours consacrées à la recherche des aflatoxines. En 1975, il a été reporté en Inde une épidémie d'hépatite affectant l'homme et le chien caractérisée par une jaunisse (décès de 97 personnes et de plusieurs chiens dans 200 villages). La maladie a été associée à la consommation de maïs contaminé fortement par *Aspergillus flavus*. Un échantillon de foie obtenu à l'autopsie a montré la prolifération des cellules biliaires et des cellules géantes. La maladie semble être le résultat d'une aflatoxicose. L'analyse des échantillons contaminés a montré que les personnes

touchées pourraient avoir consommé entre 2 et 6 mg d'aflatoxine par jour sur une période d'un mois. Les taux d'AFB<sub>1</sub> retrouvés dans les aliments étaient en moyenne entre de 6,25 à 15,6 mg/kg (Krisshnamachari *et al.*, 1975 ; Tandon *et al.*, 1977).

Une épidémie de maladie chronique du foie a été étudiée dans un chenil. L'anorexie, la dépression, la polyurie, polydypsie, jaunisse et une diathèse hémorragique terminale ont été notés chez les chiens cliniquement affectés. L'aflatoxicose a été confirmée par la présence significative d'AFB<sub>1</sub> dans les aliments pour chiens commerciaux (17 marques). L'autopsie a révélé une hépatite aiguë. Le taux moyen d'AFB<sub>1</sub> retrouvé était de 60 µg/kg (Greene *et al.*, 1977). Quatre chiens sont morts et 5 ont été euthanasiés après des signes d'insuffisance hépatique. Ces animaux avaient consommé des aliments commerciaux contaminés par les aflatoxines. L'analyse des aliments et des échantillons de foie ont confirmé l'exposition à l'aflatoxine. Des foies pâles, élargis et jaunes ont été observés à l'autopsie chez les chiens ayant une atteinte subaiguë, et une cirrhose a été notée chez le chien avec une atteinte chronique. L'analyse des aliments a révélé des niveaux élevés d'aflatoxine B<sub>1</sub> (gamme de 223 à 579 µg/kg), le tissu hépatique contenait de l'aflatoxine B<sub>1</sub> et le métabolite M<sub>1</sub> à des taux allant de 0,6 à 4,4 µg/kg. Bien que les chiens ne soient pas couramment affectés par l'aflatoxicose, ils sont très sensibles et peuvent présenter des signes classiques d'une hépatopathie aiguë ou chronique (Newman *et al.*, 2007).

### 2.3.4 ZEA

Dans notre étude, quasiment tous les échantillons analysés (croquettes de chat et de chien) contenaient de la ZEA ou un dérivé, à des taux allant de 0,85 à 195 µg/kg (médiane=10,6 µg/kg) pour les croquettes pour chiens et de 10 à 255 µg/kg pour les croquettes pour chats (médiane=80 µg/kg).

Ces résultats rejoignent les résultats de l'équipe de Zwierchowski *et al.* (2004) où la ZEA et ses dérivés ont été retrouvés dans 48 échantillons (chat et chien) sur les 57 analysés (aliments standards et thérapeutiques) avec une moyenne de 36,18 µg/kg. La concentration la plus élevée était de 299,5 µg/kg dans un aliment standard et de 158 µg/kg dans un aliment thérapeutique (cet aliment est recommandé pour les chiens ayant des problèmes rénaux).

L'équipe de Cullen (1994) a analysé 100 échantillons d'aliments commerciaux pour chien, un échantillon contenait de la ZEA à une concentration de 250 µg/kg, mais aucun échantillon ne contenait de l'AFB<sub>1</sub> à un taux supérieur à 20 µg/kg. Par contre Scussel *et al.* (2006) ont analysé 123 échantillons d'aliments pour animaux : 46 pour chien, 19 pour chat, 6 pour hamster, 26 pour chevaux, 3 pour oiseaux et 3 pour lapin. 4,9 % des échantillons contenaient de l'AFB<sub>1</sub> à des taux supérieur à 50 µg/kg et 15,5% des échantillons contenaient de la ZEA à des taux supérieurs à 50 µg/kg.

### 2.3.5 FB

Les résultats que nous avons obtenu pour les fumonisines sont nettement plus élevés en comparaison à d'autres travaux. Tous les échantillons (100%) contenaient des fumonisines. Les taux de fumonisines (FB<sub>1</sub> et FB<sub>2</sub>) obtenus dans notre étude varient de 3 µg/kg à 3,05 mg/kg (médiane=126,5 µg/kg) dans les croquettes pour chiens et de 23,6 µg/kg à 18,6 mg/kg dans les croquettes pour chats (médiane=252 µg/kg). Ces valeurs dépassent celles obtenues dans les croquettes de chien (3 sur 20 échantillons) analysées par l'équipe de Martins (2003), où la concentration de la FB<sub>1</sub> variait de 12 à 24 µg/kg. Par contre, nos résultats sont en adéquation avec ceux de Scudamore *et al.* (1997) où la FB<sub>1</sub> était retrouvée dans 30% des échantillons analysés (35 pour chiens, 35 pour chats, 15 pour oiseaux domestiques et 15 pour oiseaux sauvages) à des taux variant de 90 à 690 µg/kg. Avec un maximum de 750 µg/kg de FB retrouvée dans un aliment de chat.

Hopmans et Murphy (1993) ont analysé deux aliments pour chien, deux aliments pour chat et un aliment pour rat. Ils ont retrouvé de la FB<sub>1</sub> et de la FB<sub>2</sub> dans les cinq échantillons à des taux variant respectivement de 219 µg/kg à 1,41 mg/kg et de 20 à 144 µg/kg.

### 2.3.6 DON

Dans notre étude, le DON est présent dans tous les échantillons à des taux allant de 20 µg/kg à 650,8 µg/kg dans les croquettes de chien (médiane=126,5µg/kg) et de 8,9µg/kg à 500,1µg/kg dans les croquettes de chat (médiane=102,35 µg/kg).

Dans l'étude de Martins *et al.* (2003) citée précédemment, le DON a été retrouvé dans seulement trois échantillons de croquettes de chien (sur 60 échantillons analysés : 20 chiens, 20 chats et 20 oiseaux domestiques) à des taux allant de 100 à 130 µg/kg.

On note une nette diminution du taux d'AFB<sub>1</sub> dans l'alimentation animale au cours de ces dernières années. Cela veut dire qu'il y a eu des progrès en terme de contrôle de l'AFB<sub>1</sub>. Elle est la mycotoxine la plus surveillée et la seule réglementée en alimentation animale. Néanmoins, il ne faut pas négliger les effets des autres toxines (OTA, FB, DON et ZEA) ainsi que l'effet synergique que peuvent avoir ces mycotoxines entre elles même à faible dose.

## 3. Simulation de l'apport en plusieurs mycotoxines simultanément

La présence simultanée de plusieurs mycotoxines dans l'aliment pose des problèmes en alimentation humaine et animale du fait de leurs interactions.

### 3.1 Alimentation humaine

Nous avons calculé sur la base de nos analyses des aliments, l'apport en différentes mycotoxines pouvant être ingérées par un homme de 60 kg dans le cadre d'un menu constitué avec les aliments analysés.

#### 3.1.1 L'apport en OTA

Le comité scientifique de l'alimentation humaine (CSAH : Scientific committee on food of the European Union) de l'Union européenne a conclu dans son évaluation en 1998 que les taux d'OTA devraient être minimisés en raison de son effet néphrotoxique, cancérigène et génotoxique. La dose journalière tolérable sur la base des effets cancérogènes a été fixée à 5 ng/kg/poids corporel (pc). Ceci a été confirmé par les experts canadiens (Kuiper-Goodman *et al.*, 2010). Sur cette base là, la quantité maximale pouvant être absorbée par un adulte de 60 kg est de 300 ng et de 50 ng pour un enfant de 10kg.

##### 3.1.1.1 Dans les céréales brutes : blé, orge, riz

Nous avons établi notre calcul sur la base d'une contamination moyenne en OTA de 0,42µg/kg dans le blé, de 8,3 µg/kg dans l'orge et de 15,4 µg/kg dans le riz.

La baguette de pain de 100 g fabriquée avec du blé contaminé à 0,42 µg/kg de blé fournira 42 ng d'OTA. Durant la journée, on consomme environ une demi-baguette en moyenne, ce qui correspond à un apport de 21 ng d'OTA soit 7% de la dose journalière tolérable en OTA (300 ng/j) pour une personne de 60 kg.

Si on considère qu'une personne peut consommer aussi du pain préparé à base de farine d'orge contaminé à raison de 8,3 µg/kg. Une demi-baguette de 50 g apportera 415 ng d'OTA. La consommation seule d'une demi-baguette de pain à base d'orge conduirait à l'ingestion d'une quantité d'OTA supérieure (1,4 fois soit 138%) à la DJT.

L'orge peut être aussi utilisé pour la préparation de gâteaux. La consommation est peut être assez ponctuelle pour certaines personnes, comme elle peut être assez fréquente pour des grands gourmands. Dix grammes de biscuits fourniront 83 ng d'OTA, soit 28% de la DJT.

Dans le cas du riz, pour la préparation d'un repas à base de riz pour une personne on utilise une quantité de 100g. Si on considère que le riz est contaminé à 0,515µg d'OTA par kg, l'apport est de 51,5ng d'OTA, cela représente 17% de la DJT fixée pour une personne de 60kg.

### 3.1.1.2 Dans le jambon

La contamination dans les produits animaliers se fait en général par passage et accumulation dans les produits gras ; mais nous avons vu que cette contamination pouvait provenir du développement d'*Aspergilli* et *Penicillia* suite à un mauvais séchage. Cette contamination dépasse largement celle due au passage dans les tissus.

Si on prend en considération le jambon conditionné sous vide d'apparence normale, contaminé en surface à 478,2 µg/kg et à 71,2 µg/kg en profondeur, la consommation de trois tranches de jambon de 300 g apporte 164,8 µg, soit une teneur plus de 500 fois supérieure à la DJT.

### 3.1.1.3 Dans le lait

En se basant sur l'échantillon le plus contaminé en OTA qui est de 93,5 ng/l, la consommation d'un demi-litre de lait apporte 46,75 ng d'OTA. Cela représente 15% des apports journaliers tolérables (300 ng/jour) pour un homme de 60 kg.

Un adulte peut consommer pour le petit déjeuner avec des céréales jusqu'à 250 ml de lait, soit un apport de 23,4 ng/jour, ce qui représente 7,8% de la DJT fixée pour une personne de 60 kg.

Pour un enfant de 10 kg, la consommation d'un litre de lait (93,5 ng) représente plus de 1,5 fois (187%) la quantité journalière tolérable (50 ng/jour). Cet aliment est consommé quotidiennement par les enfants et à des quantités importantes nécessaires à leur croissance. Ceci est d'autant plus grave pour les enfants (population sensible) que la ZEA a aussi été retrouvée dans cet aliment.

### 3.1.1.4 Dans le café

Nous avons analysé l'OTA directement dans le café « boisson ». Sur la base de la valeur maximale retrouvée dans un café dosette, la tasse de café (50 ml) contient 4,043 ng. La consommation moyenne de café est de trois tasses par jour apportant ainsi 12,13 ng d'OTA journalièrement. Cette quantité représente 4% de la dose journalière tolérable pour un homme de 60kg (300ng/j). Un fort consommateur de café peut boire sur une journée jusqu'à environ l'équivalent de 20 tasses de café, soit 27% de la DJT.

## 3.1.2 ***L'apport en AFB<sub>1</sub>***

Les aflatoxines, notamment l'aflatoxine B<sub>1</sub>, sont des substances cancérigènes génotoxiques. Pour ce type de substances on considère qu'il n'existe aucun seuil en dessous duquel aucun effet néfaste n'est observé. Il n'est donc pas possible de fixer une dose journalière tolérable. En l'état actuel des connaissances scientifiques et techniques ainsi que des améliorations des modes de production et de stockage, il n'est pas possible d'éliminer complètement le développement de ces moisissures et, en conséquence, la présence des aflatoxines dans les produits. Il y a donc lieu de fixer des limites au niveau le plus faible qu'il soit raisonnablement possible d'atteindre (= principe ALARA *as low as reasonably achievable*).

La législation (JEFCA, 2001) a défini une dose journalière tolérable pour l'aflatoxine de 1ng/kg pc/j en se basant sur les études de cancer du foie, soit 60ng/jour pour un homme de 60kg.

### 3.1.2.1 Dans le jambon

Dans notre étude, le jambon conditionné sous vide d'apparence normale présente une contamination en AFB<sub>1</sub> de 0,41 µg/kg. Pour une consommation de 300g de jambon conditionné sous vide d'apparence normale, l'homme de 60kg va ingérer 123ng. Sur une journée, une consommation seule de jambon apporte une quantité d'AFB<sub>1</sub> 2 fois plus grande que la dose journalière tolérable en AFB<sub>1</sub>. Cela représente 205% de la DJT.

### 3.1.3 L'apport en FB

En 2002, le CIRC (Centre International de la Recherche sur le Cancer) a évalué la FB<sub>1</sub>. Sur la base des études de carcinogénicité, il recommande une valeur limite de 300ng/kg pc/j. (18000ng/jour pour un homme de 60kg). Ceci implique donc une ingestion inférieure à 18 µg/jour pour un individu pesant 60 kg et inférieure à 3µg / jour pour un enfant de 10kg. C'est cette référence que nous avons retenu pour nos calculs.

En ce qui concerne la contamination des aliments à base de maïs, la réglementation est entrée en vigueur le 1<sup>er</sup> Novembre 2007. Elle s'est partiellement appuyée sur l'évaluation effectuée par le centre international de la recherche sur le cancer, en février 2002 qui a classé la FB<sub>1</sub> "potentiellement cancérigène pour l'homme" (groupe 2B).

#### 3.1.3.1 Dans le riz

L'apport en FB *via* le riz le plus contaminé est de 15,4 µg/kg soit 1,54 µg par jour pour une ration de 100g de riz, c'est-à-dire environ 9% la DJT pour un adulte de 60 kg (18 µg/j).

Pour un enfant de 10 kg en se fondant sur le potentiel cancérigène des fumonisines (300 ng/kg poids corporel/ jour) la dose journalière tolérable est de 3 µg/jour. Pour une consommation de 50 g de ce riz, 0,77 µg de FB sont ingérés. Cela représente 25% de la DJT.

Ceci est préoccupant surtout pour les populations asiatiques pour lesquelles cet aliment est ingéré quotidiennement. Il est important de rappeler que la législation ne fixe aucune valeur limite en fumonisines dans le riz.

### 3.1.4 L'apport en ZEA

Les résultats des effets sur la reproduction chez le singe (No Observed Adverse Effect Level = dose sans effet de 50µg/kg/j) permettent de calculer une limite toxicologique de 100ng/kg/j prenant en compte un facteur de sécurité de 500. Néanmoins les instances réglementaires ont défini une dose journalière admissible pour la zéaralénone de 0,2µg/kg pc/j, soit 12µg/j pour un adulte de 60kg et 2µg/j pour un enfant de 10kg.

La législation qui a pris effet au 1<sup>er</sup> novembre 2007 impose de ne pas dépasser 100µg/kg dans les céréales pour petit-déjeuner. Pour les produits destinés aux enfants en bas âge (<3ans) la limite a été fixée à 20 µg/kg d'aliment.

La zéaralénone n'est réglementée que dans les produits contenant du maïs, néanmoins on l'a retrouvé dans des échantillons de base de blé, avoine, riz, dépourvu de maïs et dans les céréales de petit déjeuner (Tozlovanu, 2008, Molinié *et al.*, 2005). Dans notre étude sur les céréales nous nous sommes intéressés seulement à l'OTA et CIT.

#### 3.1.4.1 Dans le lait

La quantité de zéaralénone ingérée *via* le lait contaminé (2,6 µg/l) est de 0,65µg pour 250ml de lait. Soit plus 5% de la DJT pour un adulte de 60kg (12µg/j).

Pour une enfant de 10 kg, la consommation moyenne est de un litre de lait par jour. La quantité de ZEA apportée par jour est de 2,6µg, cela représente plus de 130% de la DJT pour un enfant de 10kg (2µg/kg).

Nous avons reporté ces valeurs d'apport en mycotoxines dans le tableau 44 sur une journée pour évaluer les quantités ingérées par un adulte de 60 kg. Ces valeurs ingérées ont été comparées aux doses journalières tolérables vis-à-vis d'un effet cancérigène pour les mycotoxines cancérigènes : AFB, OTA et FB et en se basant sur des études de perturbation du cycle œstrogénique pour la ZEA.

Tableau 44 : Simulation de l'apport en plusieurs mycotoxines simultanément dans le cadre d'un menu d'une journée. Les toxines sont exprimées en ng/kg

	AFB <sub>1</sub>	OTA	ZEA*	FB
<b>Petit déjeuner</b>				
Un bol de céréales de petit déjeuner (30g) au lait (250ml)	+	23,4ng (lait) 78ng (céréales)	650ng	2719 ng
Une tasse de café		4ng		
<b>Déjeuner</b>				
½ baguette de pain au blé (50g)		21ng		
Une salade avec des olives (10g)	24,25 ng	6,7 ng		
2 tranches Jambon (300g)	123ng	164,8µg		
Un verre de vin	+	+		
Une tasse de café		4ng		
<b>Collation</b>				
Gâteaux aux céréales (10g)		83ng		
Une tasse de café		4ng		
<b>Dîner</b>				
½ baguette de pain à l'orge (50g)		415ng		
Un plat de riz (100g)		51,5ng		1540ng
Un verre de vin	+	+		
Une tasse de café		4ng		
<b>Total</b>	147,25ng	165494,6	650ng	4259ng
Sur la base de la cancérogénèse ou l'œstrogénicité, la DJT est de	1 ng/kg/j	5ng/kg/j	200ng/kg/j	300ng/kg/j
QJT d'un sujet de 60 kg en ng	60 ng	300ng	12000ng*	18000ng
Dépassement de DJT d'un adulte de 60kg chaque jour	> 2,45 fois 245%	> 550fois 55164%	Non dépassé* 5,4%	Non dépassé 23,7%

\*pour cette mycotoxine la valeur a été comparée à l'effet œstrogénique.

DJT : dose journalière tolérable ; QJT : quantité journalière tolérable.

Le signe + (indiqué dans le tableau) signifie la possibilité de présence de mycotoxines dans les aliments, mais par manque de données, nous indiquons juste leur existence. Les valeurs calculées sont donc sous-estimées puisque nous avons comptabilisé le taux de mycotoxines retrouvé dans les aliments que nous avons analysés nous mêmes (café, jambon, céréales). Nous avons ajouté les valeurs moyennes de contamination en OTA (668 ng/kg) et AFB<sub>1</sub> (2425ng/kg) dans les olives selon les résultats obtenus par El Adlouni *et al.* (2006). Les taux moyen de contamination en mycotoxines (OTA=2,6µg/kg, FB<sub>1</sub>=90,65µg/kg) dans les céréales du petit-déjeuner utilisés dans le tableau ci-dessus sont ceux obtenus par Molinié (thèse 2004).

L'apport en mycotoxines peut être réalisé par d'autres aliments pouvant être consommés dans la même journée dans le cadre d'un repas complet. Il a été démontré que les mycotoxines peuvent être retrouvées dans les céréales de petit déjeuner, le café, le vin, la bière, les olives, les noix et les épices (Thèse Tozlovanu, 2008, Imperato *et al.*, 2011).

Il est important de rappeler que ces valeurs utilisées pour le calcul de la simulation ne prennent pas en compte le rendement de l'extraction. Ceci signifie que les quantités réelles en mycotoxines sont plus élevées.

Les doses journalières tolérables (basées sur l'effet cancérogène) en OTA et AFB<sub>1</sub> sont largement dépassées, plus de 550 fois pour l'OTA et 2,5 fois pour l'AFB<sub>1</sub>. Il convient néanmoins de pointer du doigt qu'en faisant notre stimulation une grande part de l'OTA et de l'AFB<sub>1</sub> proviennent du jambon qui était anormalement moisi. Même en enlevant cette valeur, le taux d'OTA est 2,3 fois trop important. Quant à la FB et la ZEA les doses ingérées dans notre menu restent raisonnables. Néanmoins leur présence peut accentuer l'effet des deux autres mycotoxines comme nous le verrons dans le chapitre suivant (chapitre II).

### 3.2 Alimentation animale

Nous avons calculé sur la base des résultats obtenus dans les croquettes de chat et de chien, l'apport en différentes mycotoxines pouvant être ingérées dans le cadre d'une ration pour un chat ou un chien.

#### 3.2.1 Pour les chats

Nous avons calculé la moyenne en mycotoxines rencontrées dans trois croquettes de chat provenant d'éleveurs de la même marque (M). Les chats nourris avec ces trois aliments ont eu des problèmes de santé, qui seront développés dans le chapitre II.

Nous avons simulé l'apport en mycotoxines dans une ration journalière pour un chat de 3 kg, dont la ration journalière recommandée est de 45 g (tableau 45).

Tableau 45 : Simulation de l'apport en plusieurs mycotoxines simultanément dans une ration de chat

	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b>OTA</b>	<b>ZEA*</b>	<b>FB</b>
Concentration moyenne des 3 échantillons de la marque M	1,37 µg/kg	0,73 µg/kg	53,52µg/kg	290,7µg/kg
Quantité moyenne en mycotoxine dans 45g d'aliment (ng) (par jour)	61,65ng	32,85 ng	2408,4 ng	13081,5 ng
Sur la base de la cancérogénèse ou l'effet œstrogénique, la DJT est de	1 ng/kg/j	5ng/kg/j	200ng/kg/j	300ng/kg/j
QJT d'un chat de 3 kg en ng	3ng	15ng	600ng*	900ng
% DJT d'un chat de 3kg	>20,5 fois 2055%	>2 fois 219%	>4 fois* 401%	>14,5 fois 1533,5%

\*pour cette mycotoxine la valeur a été comparée à l'effet œstrogénique.

DJT : dose journalière tolérable ; QJT : quantité journalière tolérable

Dans tous les cas, la dose journalière tolérable vis-à-vis d'un effet cancérogène est largement dépassée pour les mycotoxines cancérogènes : AFB, OTA et FB (en se basant sur les doses établies par les études de cancérogénicité). Pour la toxine œstrogénique (ZEA), les taux obtenus dans ces croquettes de chat dépassent de 4 fois les doses établies en se basant sur des études de perturbation du cycle œstrogénique.

#### 3.2.2 Pour les chiens

Nous avons simulé l'apport en mycotoxines dans une ration journalière pour un chiot de 2 kg, un chien moyen de 10 kg et un chien adulte de 25 kg, les quantités journalières recommandées sont en moyenne respectivement de 40 g, 150 g et 300 g (tableau 46).

Nous avons calculé la moyenne en mycotoxines retrouvées dans les croquettes de chien analysées à la demande de l'INC selon leur emploi (pour chiot ou pour adulte).

Pour la simulation du chiot (2kg), nous avons calculé la moyenne de l'apport en mycotoxines dans les cinq croquettes destinées à l'alimentation pour chiot (36, 37, 38, 39, 40).

Pour la simulation du chien de 10 kg, nous avons calculé la moyenne en mycotoxines apportées par les croquettes destinées à l'alimentation des chiens de 1 à 10 kg (catégories adulte et sénior) (11, 13, 14, 15, 21, 22).

Pour la simulation du chien de 25kg, l'apport en mycotoxines a été calculé à partir des croquettes pour adulte et sénior (12, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27).



Tableau 46 : Simulation de l'apport en plusieurs mycotoxines simultanément dans une ration de chien

	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b>OTA</b>	<b>ZEA*</b>	<b>FB</b>
Sur la base de la cancérogénèse ou l'œstrogénicité, la DJT est de	1ng/kg/j	5ng/kg/j	200ng/kg/j	300ng/kg/j
<b>Chiot de 2kg</b>				
Concentration moyenne des 5 croquettes de chiot (26-30)	6ng/kg	0,63 µg/kg	8,5µg/kg	43µg/kg
Quantité moyenne en mycotoxine dans 40g d'aliment (ng) (par jour)	0,24ng	25,2ng	340ng	1720 ng
QJT d'un chiot de 2 kg en ng	2ng	10ng	400ng	600ng
% DJT d'un chiot de 2kg	Non dépassé 12%	>2,5 fois 252%	Non dépassé* 85%*	>2,9 fois 287%
<b>Chien de 10 kg</b>				
Concentration moyenne des 10 croquettes de chien adulte (1-10)	0,035µg/kg	0,53 µg/kg	13,1µg/kg	131,67µg/kg
Quantité moyenne en mycotoxine dans 150g d'aliment (ng) (par jour)	5,25ng	79,5ng	1965ng	19750,5ng
QJT d'un chien moyen de 10 kg en ng	10ng	50ng	2000ng	3000ng
% DJT d'un chien de 10kg	Non dépassé 52,5%	>1,6 fois 159%	Non dépassé* 98%*	>6,6fois 658%
<b>Chien de 25kg</b>				
Concentration moyenne des 10 croquettes de chien adulte (1-10)	0,02µg/kg	0,87 µg/kg	7,43µg/kg	118,9µg/kg
Quantité moyenne en mycotoxine dans 300g d'aliment (ng) (par jour)	6ng	261ng	2229ng	35670ng
QJT d'un chien adulte de 25 kg en ng	25ng	125ng	5000ng	7500ng
% DJT d'un chien de 25kg	Non dépassé 24%	>2 fois 208,8%	Non dépassé* 44,6%*	>4,8 fois 475,6%

\*pour cette mycotoxine la valeur a été comparée à l'effet œstrogénique.

DJT : dose journalière tolérable ; QJT : quantité journalière tolérable

Les doses journalières tolérables vis-à-vis d'un effet cancérogène sont largement dépassées dans les croquettes de chien pour les mycotoxines cancérogènes (OTA et FB).

En ce qui concerne les mycotoxines (AFB<sub>1</sub> et la ZEA), les doses tolérables ne sont pas dépassées mais restent importantes, elles représentent de 12% à 98% de la DJT.

Ces deux tableaux permettent de montrer que les DJT sont dépassées pour les toxines dans les croquettes de chat et de chien. De plus, comme nous le savons, la présence simultanée de plusieurs mycotoxines a un effet synergique, ce qui aggrave d'avantage leurs effets sur la santé humaine et animale.

## 4. Conclusion du chapitre

Les mycotoxines de champ (FB, ZEA, DON) et les mycotoxines de stockage (OTA, CIT, AFB) ont été recherchées dans l'alimentation humaine et animale. Sur l'ensemble des échantillons analysés (d'origine animale ou végétale), une multi-contamination est présente. Certains échantillons dépassent la limite autorisée en alimentation humaine (pour nourrissons).

Certaines mycotoxines ont une toxicité aiguë très marquée, mais il est exceptionnel en Europe d'être intoxiqué par une seule ingestion d'aliment contaminé. Par contre il est important de s'intéresser à l'exposition répétée à de faibles doses (effets chroniques) pouvant notamment être à l'origine de cancer. Nous avons montré que sur une journée, les doses journalières tolérables peuvent être dépassées pour plusieurs toxines simultanément.

Non seulement, ces toxines se retrouvent en co-contamination mais elles sont résistantes au procédé de transformation, ce qui les rend encore plus dangereuses pour la santé humaine et animale. Il est donc primordial de mener des recherches sur le mode de toxicité individuelle et en co-contamination. Ceci est étudié dans le chapitre II.

## **Résultats et discussions**

---

### **Chapitre II**

#### **Les effets toxiques de la multi-contamination par les mycotoxines**

Dans ce chapitre, le but de notre étude est d'étudier les effets combinés de l'ochratoxine A (OTA) à la citrinine (CIT) et /ou à la fumonisine B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), souvent trouvées simultanément, notamment dans les Balkans où sévit la néphropathie endémique (Peraica *et al.*, 1999). L'OTA est aussi fréquemment associée à la zéaralénone (ZEA), ce qui pourrait entraîner une baisse de la fertilité chez les animaux d'élevage.

L'impact de telles multi-contaminations est peu étudié, bien que quelques études pointent des effets de synergie (Speijers *et al.*, 2004).

Dans une première partie, nous avons étudié l'effet cytotoxique de l'OTA, la CIT, la ZEA et la FB<sub>1</sub> seules ou en combinaison sur des lignées cellulaires, les cellules rénales d'opossum (OK), les cellules rénales humaines (HK2) et les cellules de glandes mammaires humaines (MCF7).

Nous avons suivi l'effet combiné sur la viabilité cellulaire et sur la génotoxicité. L'effet génotoxique de ces mycotoxines seules ou en combinaison a été recherché sur les cellules rénales humaines (HK2).

Dans une deuxième partie, deux études animales sur le rat et le porc portent sur l'effet génotoxique au niveau rénal de l'OTA et de la FB<sub>1</sub> combinées.

Dans la troisième partie nous décrivons des études de terrain : la baisse de la fertilité et de la tératogénicité chez le chat ; la relation entre la présence des mycotoxines dans l'alimentation des chevaux et le décès de ces animaux.

## 1. Effet sur les cellules

Nous avons suivi l'effet des mycotoxines combinées sur la viabilité cellulaire et sur la génotoxicité. Nous avons choisi les cellules rénales car le rein est un organe cible pour l'OTA, la CIT et la FB<sub>1</sub>. Comme la ZEA a un effet œstrogénique, nous avons utilisé dans ce cas les cellules humaines de glandes mammaires (MCF7).

### 1.1 Evaluation de l'effet cytotoxique de l'OTA, de la CIT et de la FB

#### 1.1.1 Comparaison de l'exposition des cellules rénales humaines (HK2) et d'opossum (OK) à l'OTA, la CIT, la FB<sub>1</sub>

Nous avons comparé l'effet de chaque toxine prise individuellement sur les deux types cellulaires (HK2 et OK) (voir figure 92).

##### 1.1.1.1 Effet de l'OTA

Les cellules rénales d'opossum (OK) sont plus sensibles à l'OTA que les cellules rénales humaines (HK2). Une diminution de la viabilité cellulaire est observée à partir de 1µM. Cette cytotoxicité est dépendante de la concentration de l'OTA. L'effet cytotoxique de l'OTA sur la lignée rénale humaine (HK2) n'est visible qu'à partir de 5µM. Les cellules OK ne possèdent pas de système de sulfoconjugaison donc on peut penser que cette voie de métabolisation est protectrice. Ces cellules sont pourvues du système de glutathion-conjugaison (Caldwell, 1980), ceci confirme que cette voie est néfaste pour la métabolisation de l'OTA.

##### 1.1.1.2 Effet de la CIT

L'effet de la citrinine diffère selon le temps d'exposition. Sur les HK2, la CIT provoque un effet cytotoxique à 24h (rose) et un effet proliférateur à 48h (rouge). Sur les OK, la CIT n'a quasiment pas d'effet à 24h (bleu). Par contre, après 48h d'exposition (jaune), on observe un effet cytotoxique mais moins important que celui observé sur les cellules rénales humaines (HK2) 24h.

##### 1.1.1.3 Effet de la FB<sub>1</sub>

Quelque soit le temps d'exposition (24h ou 48h), la cytotoxicité induite par la FB<sub>1</sub> sur la lignée rénale humaine (HK2) est légèrement plus marquée que celle observée sur la lignée rénale d'opossum (OK). Pour les cellules d'opossum (OK) la mort cellulaire ne dépasse pas 10% à 24h et 25% à 48h de

traitement. Pour la lignée rénale humaine (HK2), la cytotoxicité atteint jusqu'à 40% à 25 $\mu$ M après 48h d'exposition. Le peu de différences entre les deux types cellulaires indique que les effets observés suite à une exposition à la FB dépendent peu, voire pas du tout du potentiel métabolique lié à la sulfo-conjugaison.

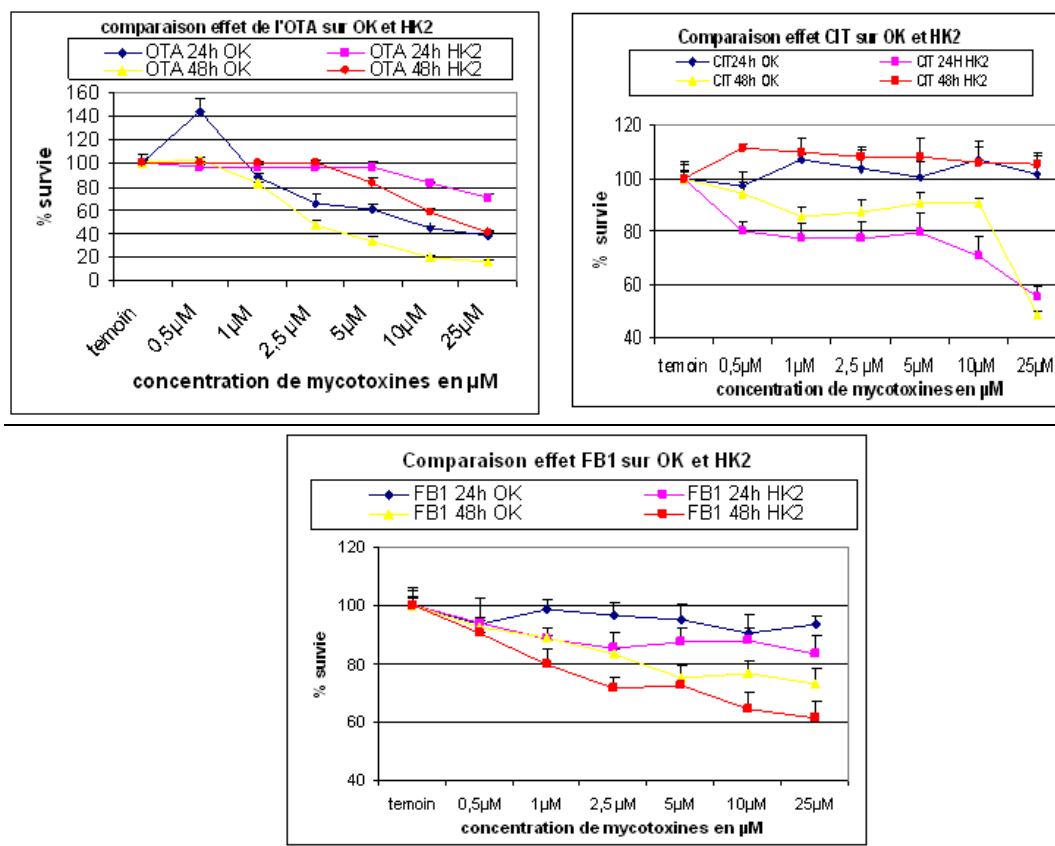


Figure 92 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) et d'opossum (OK) en fonction des doses d'OTA, de CIT et de FB<sub>1</sub> seules après 24h et 48h d'exposition.

Les cellules rénales HK2 étant plus sensibles que les OK aux trois mycotoxines testées, nous avons choisi de poursuivre les études uniquement sur les HK2.

### 1.1.2 Viabilité des cellules rénales humaines (HK2) exposées aux mycotoxines(OTA, CIT, FB)

#### 1.1.2.1 Effet de l'OTA, de la CIT, de la FB<sub>1</sub> sur les HK2

L'effet des trois toxines (OTA, CIT, FB<sub>1</sub>) prises individuellement sur la viabilité des cellules rénales humaines (HK2) est schématisé dans la figure 93.

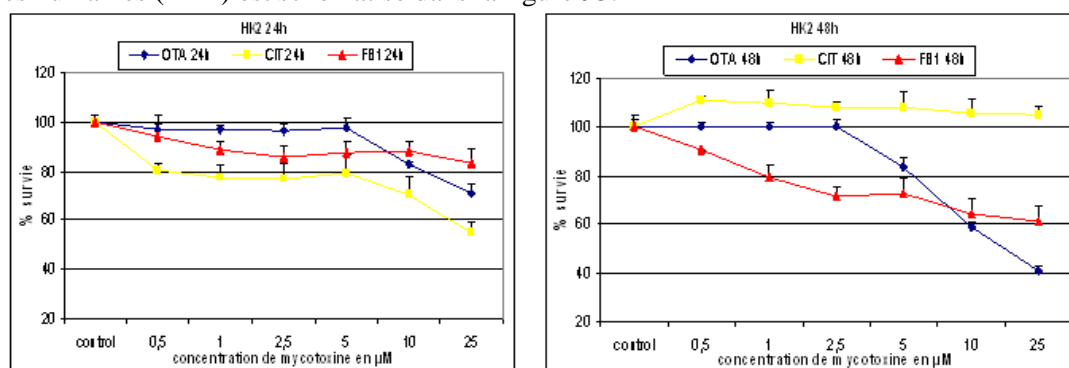


Figure 93 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des doses d'OTA, de CIT et de FB<sub>1</sub> seules après 24h et 48h d'exposition.

Après 24 h d'exposition, la CIT et la FB ont un effet cytotoxique qui est dose-dépendant. A 24h, la CIT est plus cytotoxique que la FB<sub>1</sub>, cette différence est très importante et significative pour les fortes expositions. Aux doses où l'OTA est cytotoxique (> 5µM), elle est plus cytotoxique que la FB<sub>1</sub>.

L'OTA est cytotoxique pour des expositions supérieures à 5µM. L'effet cytotoxique s'amplifie après 48h lors d'une exposition à la FB et à l'OTA. Des concentrations d'OTA non cytotoxiques le deviennent à 48 h. Par contre après 48 h d'exposition, la CIT n'est plus cytotoxique, on observe même une légère prolifération qui est significative.

#### 1.1.2.2 Effet de la coexposition des cellules HK2 à l'OTA et la CIT ou l'OTA plus CIT et FB<sub>1</sub>

Le traitement combiné OTA et CIT après 24h de traitement a été comparé à l'OTA seule et à la CIT seule (figure 94). Comme nous l'avons vu précédemment, la CIT est cytotoxique sur toute la gamme testée, quant à l'OTA, elle n'entraîne une cytotoxicité qu'à partir de 5µM. L'effet combiné des deux toxines (OTA et CIT) à 24h entraîne aussi une cytotoxicité à partir de 5µM. Cette cytotoxicité est nettement plus importante que pour chaque toxine seule. Il y a une amplification. L'exposition des cellules aux trois toxines simultanément entraîne des effets sur la viabilité cellulaire avec un profil similaire à celui de l'OTA seule dans la gamme de concentration testée (de 1µM à 50µM).

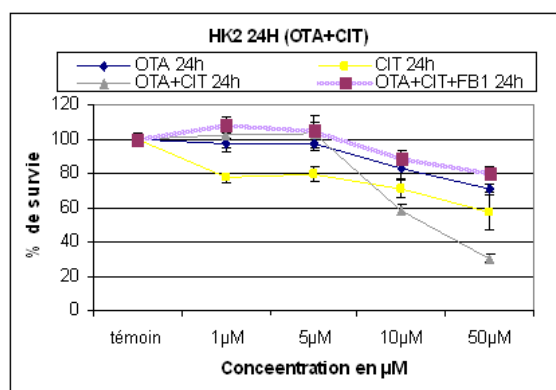


Figure 94 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des doses d'OTA et de CIT seules et combinées après 24h d'exposition.

#### 1.1.2.3 Effet de la co-exposition des cellules HK2 à l'OTA et la FB<sub>1</sub> ou l'OTA et la CIT et la FB<sub>1</sub>

Nous avons comparé l'effet combiné de l'OTA et de la FB<sub>1</sub> à l'OTA seule ou à la FB<sub>1</sub> seule (figure 95). Alors que les deux toxines seules entraînent une cytotoxicité, lorsqu'elles sont combinées, on observe une prolifération à 24h comme à 48h. La prolifération s'amplifie à 48h pour les faibles doses. Alors que pour les fortes doses on note une cytotoxicité mais nettement moins importante que pour les toxines seules. Il y a donc un effet antagoniste.

Le fait d'exposer les cellules aux trois toxines simultanément (OTA et CIT et FB<sub>1</sub>) provoque le même effet que lorsqu'il n'y avait que les deux toxines (OTA et FB<sub>1</sub>) sauf à la plus forte concentration après 24h d'exposition. A cette dose on note une amplification de la cytotoxicité. Cette amplification n'est plus observée après 48h d'exposition.

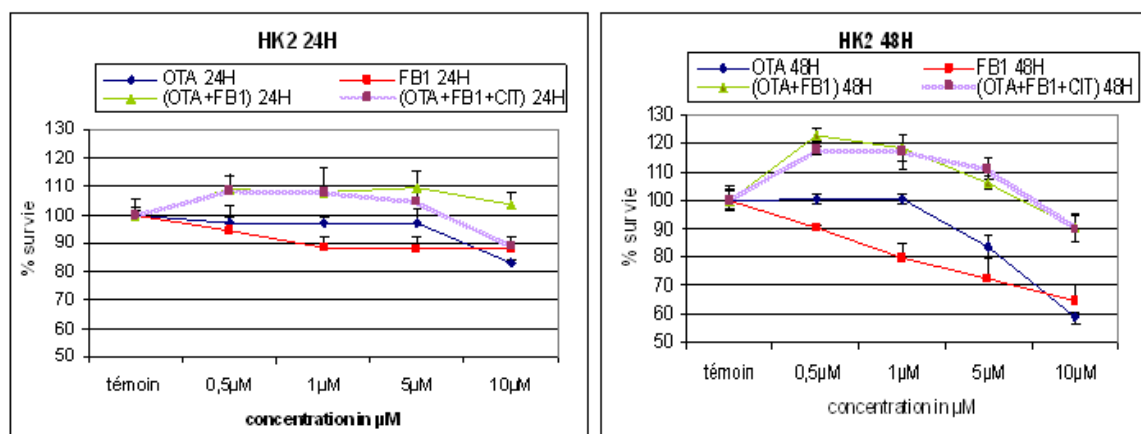


Figure 95 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des doses d'OTA, de FB<sub>1</sub> seules et combinées après 24h et 48h d'exposition.

#### 1.1.2.4 Effet de la co-exposition des cellules HK2 à la FB<sub>1</sub> et la CIT ou à l'OTA et la CIT et la FB<sub>1</sub>

Nous avons testé l'effet combiné des trois mycotoxines (FB<sub>1</sub> et CIT, FB<sub>1</sub> et OTA, FB<sub>1</sub> et OTA et CIT). Les résultats sont représentés sur la figure 96.

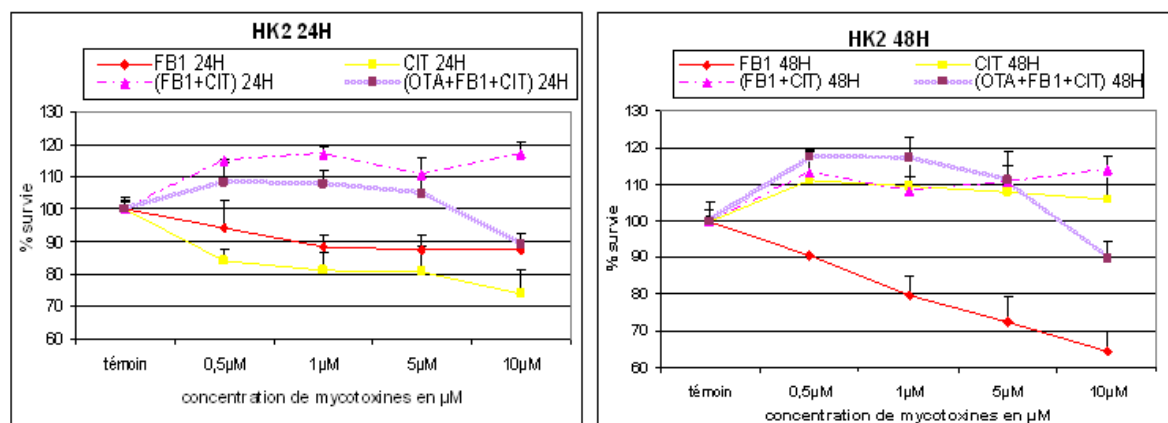


Figure 96 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des doses de CIT, de FB<sub>1</sub> seules et combinées après 24h et 48h d'exposition.

Lorsque les cellules sont exposées simultanément à des concentrations équivalentes de FB et de CIT, on observe à 24h comme à 48h d'exposition, une prolifération cellulaire, alors que les toxines séparément sont cytotoxiques. Il y a donc un effet antagoniste.

Après 48h d'exposition, la courbe FB<sub>1</sub> plus CIT se superpose à celle de la CIT seule. Lorsque les trois toxines sont présentes simultanément, l'effet est similaire à celui observé lorsque les cellules ne sont exposées qu'à la FB<sub>1</sub> et à la CIT pour les doses inférieures à 10  $\mu\text{M}$ .

Par contre, l'exposition aux trois toxines (10  $\mu\text{M}$ ) entraîne une cytotoxicité équivalente à celle observée quand les cellules sont exposées à la FB seule pendant 24 h. A 48 h, l'effet cytotoxique des trois toxines combinées est moins important que l'effet de la FB seule.

L'ensemble des résultats obtenus sur la viabilité cellulaire de cellules exposées simultanément à l'OTA, la CIT et la FB rejoignent partiellement les études faites par d'autres auteurs. Knecht *et al.*, 2005 ont mesuré l'activité métabolique et la viabilité des cellules de tubules proximaux humaines (IHKE) exposées à l'OTA (25 et 50 nM) et/ou à la CIT (0,25 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 et 15  $\mu\text{M}$ ). L'activation de la caspase 3 comme marqueur d'apoptose a été examinée à la fois pour des expositions aux mycotoxines individuellement ou en combinaison. Les résultats sont complexes puisque la réponse varie d'aucun effet à effet antagoniste en passant par un effet additif suivant la concentration en CIT. Ainsi la CIT a un effet antagoniste sur l'activation de la caspase 3 induite par l'OTA à des concentrations en CIT de 2,5 et 5  $\mu\text{M}$ . Les concentrations les plus élevées (7,5 et 15  $\mu\text{M}$ )

conduisent à effets additifs alors que les faibles concentrations de CIT (0,25 et 1 $\mu$ M) ne modulent pas l'activation de la caspase 3. Au sein de notre équipe des résultats similaires ont été obtenus. Lorsque les concentrations en CIT sont plus faibles que celles d'OTA, une diminution de la toxicité due à l'OTA seule est observée. Par contre, lorsque le taux de CIT est supérieur ou égal à celui de l'OTA, une toxicité accrue de celle de l'OTA est observée. Ceci indique que les mécanismes mis en jeu par les deux toxines ne sont pas identiques (Molinié, 2004 ; Tozlovanu, 2008 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2008).

Seules quelques études ont jusqu'ici exploré *in vitro* les interactions cytotoxiques ou apoptotiques entre la FB<sub>1</sub> et l'OTA (Creppy *et al.*, 2004). Un effet cytotoxique synergique de la FB<sub>1</sub> et de l'OTA a été observé sur des cellules rénales de singe (*green monkey kidney Vero cells*), des cellules de gliome du cerveau de rat et des cellules intestinales humaines Caco-2 (Creppy *et al.*, 2004).

Klaric *et al.* (2008) ont étudié la survie des cellules épithéliales rénales de porc (PK15) exposées à l'OTA, la FB<sub>1</sub> et la beauvericine (BEA) individuellement ou combinées en mesurant l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), l'indice d'apoptose et l'activité caspase-3. Les cellules ont été traitées avec 0,05 ; 0,5 et 5  $\mu$ g/ml de chaque mycotoxine ou avec la combinaison de deux ou des trois pendant 24 et 48 h. Une augmentation significative de l'activité LDH a été observée après 48h d'exposition à la plus forte concentration de FB<sub>1</sub> (145%), de BEA (beauvericine) (184%) et d'OTA (177%) en comparaison au témoin (100%) L'OTA a augmenté l'activité caspase-3 après 24h de traitement avec 0,5  $\mu$ g/ml (84%), tandis que la BEA (319%) et la FB<sub>1</sub> (419%) n'affectent significativement l'activité enzymatique qu'après 48h. Le traitement combiné par FB<sub>1</sub>, BEA et OTA conduit principalement à des effets additifs sur l'activité de la LDH et à des effets additifs et synergiques sur les effets de l'activité caspase-3 et l'indice apoptotique (Klaric *et al.*, 2008). Ceci est en accord avec certaines études précédentes sur les cellules rénales humains IHKE et les cellules rénales porcines LLC-PK1 (Schwerdt *et al.*, 1999 ; Seefelder *et al.*, 2003; Gopee *et al.*, 2003; Petrik *et al.*, 2005).

#### 1.1.2.5 Effet de l'exposition des HK2 à l'OTA ou à la ZEA seule ou aux deux toxines simultanément

Nous avons évalué la survie des cellules rénales humaines (HK2) exposées à des concentrations croissantes d'OTA et/ou de ZEA à 24 et 48h d'exposition (figure 97).

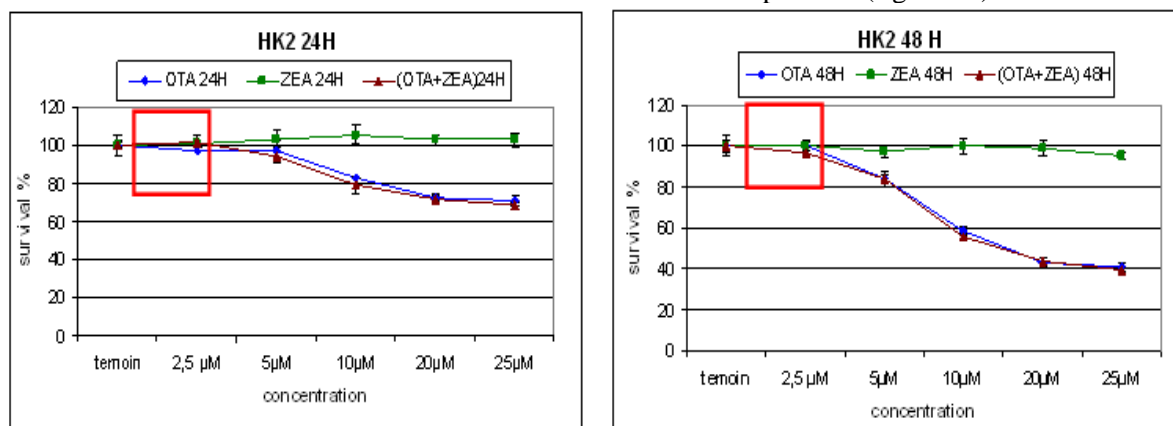


Figure 97 : Comparaison de l'effet des fortes doses d'OTA, ZEA seule et OTA+ZEA sur la survie des cellules rénales humaines HK2.

Pour les fortes doses d'OTA (> 2,5 $\mu$ M), on note une cytotoxicité significative s'amplifiant après 48h d'exposition.

Même après exposition des cellules aux fortes doses de ZEA, la viabilité cellulaire des cellules rénales humaines (HK2) n'est pas affectée.

La viabilité des cellules HK2 traitées avec le mélange (OTA+ZEA), présente un profil similaire à celui obtenu par le traitement à l'OTA seule.

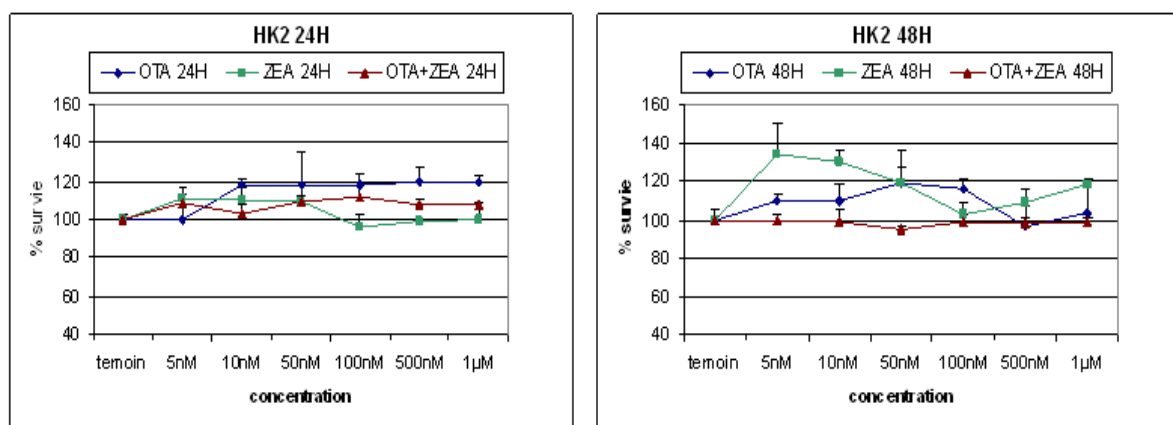


Figure 98 : Comparaison de l'effet des petites doses d'OTA, de ZEA seules ou combinées sur la survie des cellules rénales humaines HK2.

Pour les faibles concentrations ( $<1\mu\text{M}$ ), l'OTA a un effet proliférateur sur les cellules HK2 à partir de 10 nM après 24h d'exposition. Après 48h d'exposition à l'OTA, nous avons observé une prolifération jusqu'à 500nM d'OTA (figure 98).

Pour des concentrations entre 5nM et 50 nM, la ZEA entraîne une prolifération cellulaire plus marquée à 48h qu'à 24h. Pour des concentrations supérieures à 100nM, la ZEA n'affecte pas la viabilité des cellules HK2 après 24h d'exposition.

Après 24h de traitement des cellules rénales par les deux toxines (OTA plus ZEA), un léger effet proliférateur est observé à partir de 5nM, mais moins important que celui de l'OTA seule.

On constate que le traitement simultané (OTA et ZEA) à petites doses (5nM à  $1\mu\text{M}$ ), n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire des HK2 après 48h d'exposition des cellules.

### 1.1.3 Viabilité des cellules humaines mammaires (MCF7) exposées à l'OTA et /ou la ZEA

Nous avons testé l'OTA et la ZEA ainsi que la combinaison (OTA plus ZEA) sur les cellules mammaires humaines (MCF7) (figure 99 et 100). Cette lignée cellulaire est un modèle d'étude pour les perturbateurs endocriniens.

#### 1.1.3.1 Effet de l'OTA et ZEA seule et OTA+ZEA sur la viabilité des cellules MCF7

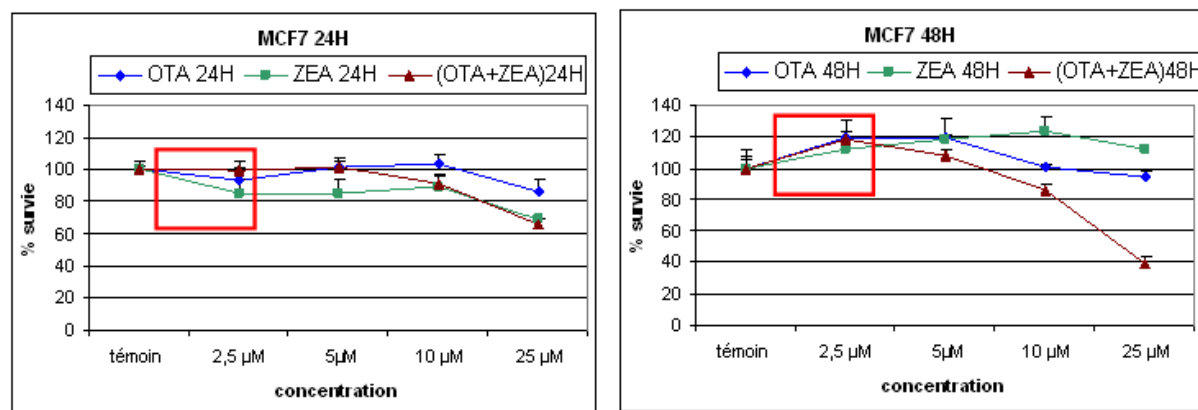


Figure 99 : Comparaison de l'effet des fortes doses d'OTA, ZEA seule et OTA+ZEA sur la survie des cellules mammaires humaines MCF7.

Après 24h de traitement à l'OTA à fortes doses, aucun effet n'est observé sauf pour  $25\mu\text{M}$ , dose entraînant une légère cytotoxicité ( $<20\%$ ). Après 48h d'exposition à l'OTA, une prolifération cellulaire significative est observée avec  $2,5\mu\text{M}$  et  $5\mu\text{M}$  (20%).

L'exposition à la ZEA, provoque une faible cytotoxicité (20%) après 24h de traitement suivie d'une prolifération cellulaire après 48h d'exposition pour les mêmes doses.



A 24h, le traitement combiné par les 2 toxines (OTA et ZEA) aux fortes doses, se superpose à l'effet de ZEA seule (cytotoxicité). L'effet cytotoxique continue à s'amplifier à 48h. Alors qu'aucune des 2 toxines n'est cytotoxique à ce temps d'exposition. Il y a donc un effet antagoniste après 48h.

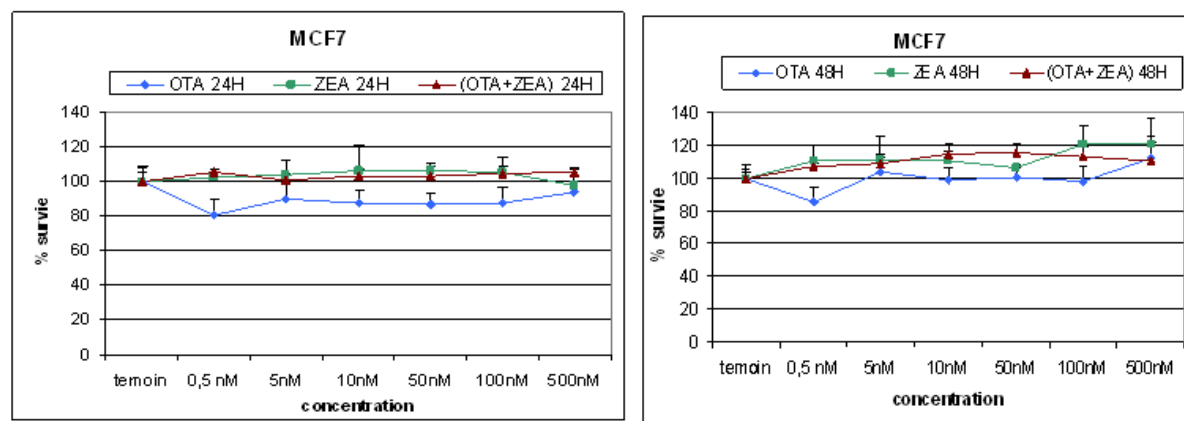


Figure 100 : Comparaison de l'effet des petites doses d'OTA, ZEA seule et OTA+ZEA sur la survie des cellules mammaires humaines MCF7.

Pour les petites doses (0,5 nM à 100nM), l'OTA seule provoque une légère cytotoxicité après 24h de traitement. Après 48h de traitement, l'OTA reste légèrement cytotoxique pour 0,5nM.

Pour les faibles concentrations de ZEA, aucune modification de la viabilité cellulaire des MCF7 n'est observée après 24h de traitement. Après 48h d'exposition, la ZEA entraîne une prolifération cellulaire des MCF7 dose dépendante.

La réponse au traitement simultané des MCF7 par l'OTA et la ZEA a la même tendance que celle observée lors de l'exposition à la ZEA seule quelque soit le temps d'exposition pour les faibles doses testées. Ceci montre bien que l'effet de ZEA prime sur celui de l'OTA sur ces cellules MCF7 (glandes mammaires), qui représentent l'organe cible de la ZEA.

#### 1.1.3.2 Comparaison de l'effet de l'OTA, et la ZEA sur la viabilité des cellules rénales humaines (HK2) et des cellules mammaires humaines (MCF7)

Les deux modèles cellulaires (HK2 et MCF7) ne se comportent pas de manières identiques vis-à-vis des deux mycotoxines et vis-à-vis des concentrations de toxines testées ( voir figure 101).

##### ➤ Effet sur les HK2

Les cellules HK2 (rénales) sont seulement affectées par l'OTA. Un effet cytotoxique est observé. La ZEA n'a pas d'effet sur les HK2. Ceci est du au fait que ce n'est pas l'organe cible de cette toxine. L'effet combiné des 2 toxines (OTA plus ZEA) sur les HK2 aux fortes doses (2,5µM-25µM) présente un profil cytotoxique similaire à celui obtenu par le traitement à l'OTA seule.

##### ➤ Effet sur les MCF7

L'OTA n'a pas d'effet sur les MCF7 à 24h. Par contre, il a été observé un effet proliférateur après 48h d'exposition pour les doses de 2,5 et 5µM d'OTA.

En ce qui concerne les cellules MCF7, elles sont sensibles à la ZEA. Avec les fortes doses de ZEA, l'effet diffère entre les 2 temps d'exposition, on note une cytotoxicité à 24h suivie d'une prolifération cellulaire des MCF7 à 48h.

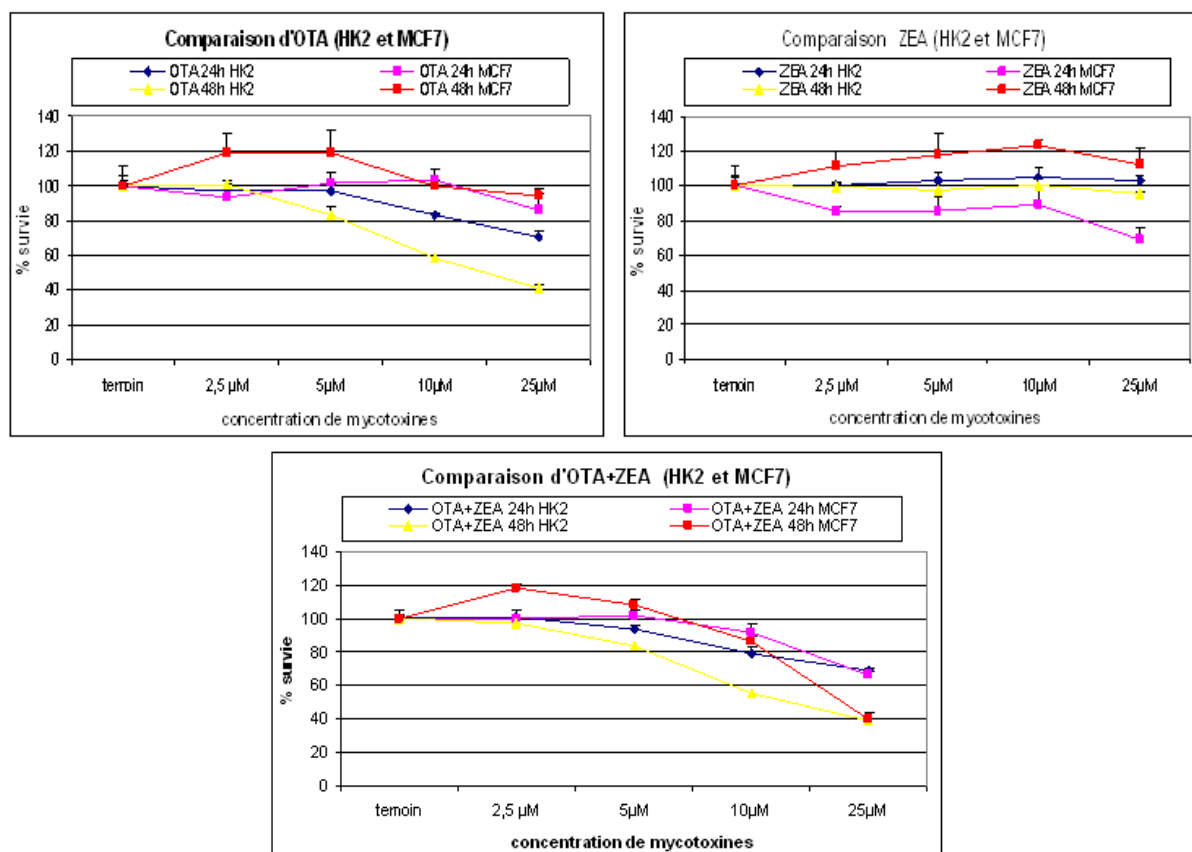


Figure 101 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) et les cellules mammaires humaines (MCF7) en fonction des doses OTA et ZEA après 24h et 48h d'exposition.

Ces résultats montrent que les deux toxines n'ont pas la même cible, puisque leur comportement diffère suivant le type cellulaire. Il est intéressant de noter que chacune des toxines induit des effets dans le type cellulaire correspondant à leur organe cible (tissu rénal pour l'OTA, effet œstrogénique pour la ZEA).

La lignée MCF7 est utilisée dans l'étude de l'effet œstrogénique car elle possède des récepteurs d'œstrogènes et répond par prolifération aux œstrogènes. Elle possède le gène sauvage codant la protéine p53, responsable de la réparation de l'ADN en cas d'altération de ce dernier. Elle a été utilisée souvent dans des études sur la prolifération cellulaire induite par la ZEA et ses dérivés pour tester les effets œstrogéniques (Minerva *et al.*, 2005).

Yu *et al.* (2005) ont montré que l'exposition des cellules MCF7 à la ZEA (2 à 96 nM) stimule la prolifération des cellules par inhibition de l'apoptose d'une manière dose-dépendante. La protéine Bcl-2 (protéines anti apoptose) est induite, tant au niveau des protéines que de l'ARNm. A l'inverse il y a inhibition de BAX (facteur pro-apoptose). L'activité proliférative de la ZEA est due à l'inhibition de l'apoptose par la modulation du ratio bax/bcl2 (Yu *et al.*, 2005).

Wang *et al.* (2010) ont démontré que la ZEA (10 et 20 nM) stimule la prolifération des cellules MCF-7). La ZEA augmente considérablement l'expression des ARNm  $\alpha$  des récepteurs des œstrogènes (ER). La génistéine (GEN) (un phytoestrogène naturelle d'isoflavones) à une concentration de 16 et 32  $\mu$ M inhibe la prolifération des cellules MCF-7 qui a été induite par la ZEA, en régulant l'expression des récepteurs des œstrogènes (ER), Bax et Bcl-2. Dans les traitements de co-contamination de génistéine et la ZEA, l'expression de l'ARNm (ER) diminue, bcl-2 diminue et Bax augmente par rapport à ceux provoqués avec la ZEA seule.

## 1.2 Impact des mycotoxines sur la génotoxicité

### 1.2.1 Effets génotoxiques de l'OTA, CIT et FB<sub>1</sub> sur les cellules HK2

Lors d'études précédentes, il a été démontré que l'OTA est génotoxique en formant des adduits covalents à l'ADN (Pfohl-Leskowicz & Manderville, 2007; Mantle *et al.*, 2010). L'OTA est un cancérigène formant des adduits à l'ADN suite à la formation de quinone (Pfohl-Leskowicz & Castegnaro, 2005, Tozlovanu *et al.*, 2006a, ; Pfohl-Leskowicz & Manderville, 2007).

La génotoxicité de l'OTA a été prouvée par la détection des adduits covalents à l'ADN par la technique de post-marquage dans les reins et autres organes de plusieurs animaux (Manderville & Leszkowicz, 2006). Il a été montré que l'OTA induit une adduction au niveau de l'organe cible, le rein, chez le rat (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 1993b). Les adduits varient d'un organe à l'autre et d'une espèce à l'autre en fonction des voies de métabolisation (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 1993a; Pfohl-Leskowicz *et al.*, 1993b; Pfohl-Leskowicz *et al.*, 2005a).

La néphropathie endémique des Balkans et les cancers des voies urinaires associées, sont vraisemblablement dus à l'exposition non seulement de l'OTA mais aussi aux autres mycotoxines retrouvées simultanément notamment la CIT et la FB (Peraica *et al.*, 2008).

Pour évaluer l'effet combiné, nous avons exposé des cellules rénales humaines (HK2) à ces toxines (OTA/CIT/FB<sub>1</sub>) seules ou combinées à la concentration de 0,5µM pendant 2h, 7h et 24h. Un exemple de profils d'adduit est présenté dans la figure 102.

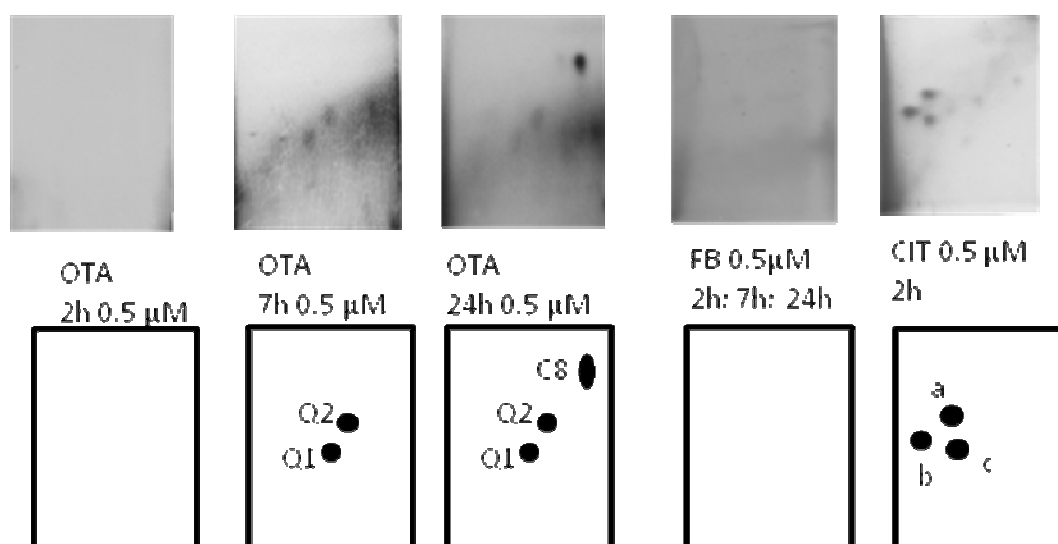


Figure 102 : Formation d'adduit à l'ADN sur les cellules rénales humaines (HK2) par l'OTA seule, la CIT seule et la FB<sub>1</sub> seule.

La FB<sub>1</sub> seule n'induit aucun adduit à l'ADN quelque soit le temps de traitement (2h, 7h et 24h). Elle est considérée comme non génotoxique par elle même.

Aucun adduit n'a été observé lorsque les cellules sont exposées à l'OTA pendant 2h. Les adduits n'apparaissent qu'après 7h d'exposition à l'OTA. Les adduits Q1 et Q2 correspondent à la formation d'OTHQ forme quinone de l'OTA (correspondant à la substitution du chlore par un groupement OH) sont formés à 7h et 24h d'exposition (figure 102).

L'adduit C-C8 dG-OTA (C8) n'est observé qu'après 24h d'exposition. L'apparition progressive des adduits en fonction du temps a été déjà observée précédemment par Tozlovanu *et al.* (2006a). L'adduit C-C8 dG-OTA (figure 103) est formé tardivement dans les cellules. Ce décalage dans l'apparition des adduits est dû au fait que l'OTA doit être métabolisée en OTHQ (figure 103). Ce résultat est particulièrement intéressant puisque cet adduit est observé surtout dans les cellules tumorales, lorsque la cyclooxygénase et la lipoxigénase sont induites (Pfohl-Leskowicz & Castegnaro, 2005).

La CIT après 2h de traitement induit trois adduits (a, b, c) sur les cellules rénales humaines (HK2), différents de ceux observés avec l'OTA. Ces adduits après 24h d'exposition ont totalement disparu. Ceci est particulièrement intéressant puisqu'à 48h d'exposition on constate qu'au lieu d'y avoir une mort cellulaire, il y a au contraire une prolifération cellulaire. La réparation des adduits provoqués par la CIT est peut être à l'origine de mutations modifiant l'expression de protéines impliquées dans la division cellulaire.

Ces trois adduits avaient été observés lorsque les cellules humaines bronchiques (WI) étaient traitées avec de la CIT seule (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2008). Cette formation est fonction de la dose. Après 24h, le nombre d'adduit diminue puis à trois jours, plus aucun adduit n'a été détecté (Molinié, 2004). La réparation dans les cellules bronchiques humaines est plus longue que dans les cellules rénales.

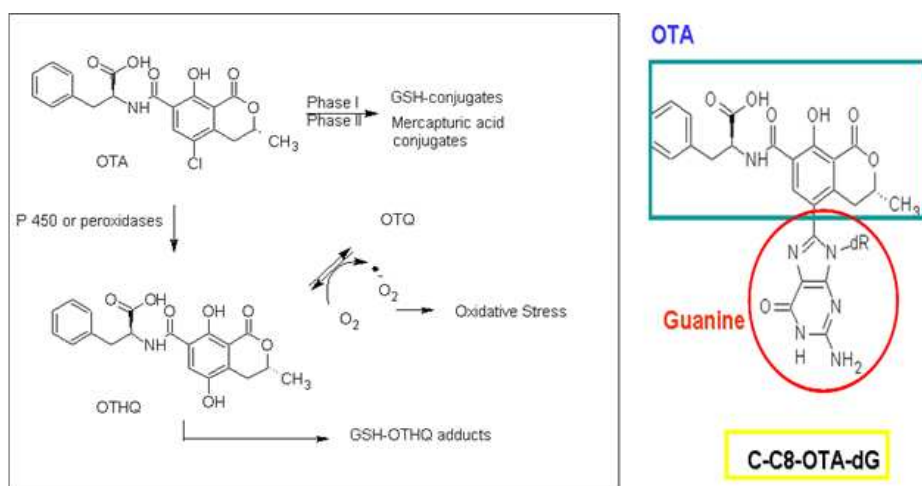


Figure 103 : Formation de l'OTHQ à partir de l'OTA (à gauche), structure chimique de l'adduit C-C8 dG-OTA (C8) (à droite).

Lorsque les cellules ont été traitées simultanément avec plusieurs toxines, une modulation des adduits est observé (figure 104).

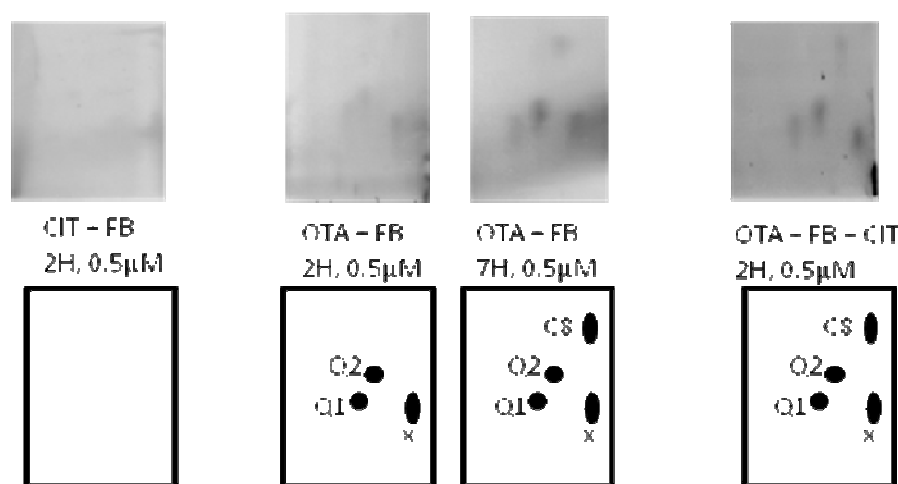


Figure 104 : Formation d'adduit à l'ADN sur les cellules rénales humaines (HK2) suite à l'exposition simultanée de plusieurs toxines après 2h de traitement.

Lors du traitement simultané des cellules rénales (HK2) par les 2 toxines (FB<sub>1</sub> et CIT), aucun adduit n'est détecté. Ceci signifie que la FB empêche la génotoxicité de la CIT.

Lorsque les cellules rénales humaines (HK2) sont traitées avec l'OTA et la CIT ou l'OTA et la FB<sub>1</sub>, ou avec les trois toxines, les profils d'adduit sont similaires entre eux et présentent des analogies avec le profil obtenu quand les cellules sont traitées par l'OTA seule. Les adduits OTHQ sont détectés dans tous les cas. L'adduit Q2 et le C-C8 dG-OTA sont amplifiés lorsque les cellules sont incubées avec les trois toxines. Un nouvel adduit X apparaît.

Les adduits retrouvés après exposition à l'OTA+ la CIT diminuent après 7h et disparaissent au bout de 24h d'exposition. Ceux observés après exposition à l'OTA et la FB<sub>1</sub> persistent après 24h de traitement.

Au sein du laboratoire, il a été montré « un effet dose » lors d'une exposition des cellules à l'OTA. Le taux d'adduit augmente avec l'augmentation de la concentration en OTA sur les cellules rénales humaines et bronchiques humaines. D'autre part, il a été observé « un effet temps ». Quelles que soient les concentrations en OTA (0,5 ; 1 ; et 2,5µM), la formation des deux adduits « OTHQ » atteignent un maximum après 7h d'exposition, puis finissent par disparaître complètement après 48h. La formation du C-C8dG-OTA est observée après exposition aux faibles doses (0,5 et 1 µM). Pour une exposition à 1µM, la formation de cet adduit augmente jusqu'à 24h. Cet adduit a aussi disparu à 48h (Tozlovanu, 2008).

L'exposition aux 3 toxines (OTAet CIT et FB<sub>1</sub>) n'induit les adduits que lorsque les cellules sont traitées 2h. Nous observons à ce temps là les trois adduits spécifiques de l'OTA. La réparation est donc très rapide contrairement à l'exposition à l'OTA seule ou combinée à la FB<sub>1</sub>. La combinaison des trois a accéléré la métabolisation de l'OTA en composé génotoxique ; et comme précédemment la réparation a modifié la viabilité cellulaire qui est augmentée à 48h comparativement à 24h.

L'ensemble de ces résultats indiquent que la formation des adduits spécifiques de l'OTA prime sur les adduits de la CIT lorsque ces dernières se retrouvent simultanément.

### 1.2.2 Effets génotoxiques de l'OTA et ZEA sur les cellules HK2

Il est assez fréquent de retrouver simultanément l'OTA et la ZEA dans les élevages de porcs. C'est pour cela que nous avons testé l'effet combiné de ces deux toxines. Comme nous l'avons vu précédemment lorsque les cellules rénales sont traitées avec l'OTA seule nous avons essentiellement trois adduits qui sont formés après 7h d'exposition à une concentration de 0,5µM d'OTA.

#### 1.2.2.1 Traitement avec la ZEA seule

Les cellules HK2 ont été exposées à la ZEA à doses croissantes: 0,01; 0,1; 0,5; 1 et 5 µM pendant 2 heures, 7 heures ou 24 heures. Un profil typique d'adduit du à la ZEA est schématisé dans la figure 105.

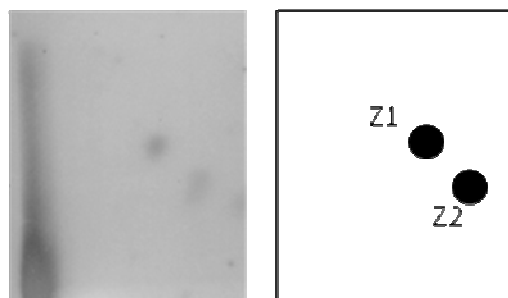


Figure 105 : Formation des adduits à l'ADN des cellules rénales humaines par la ZEA: a- traitement 24 heures 0,5 µM ZEA.

Les profils d'adduits obtenus par un traitement de ZEA après 24 heures sont différents de ceux obtenus par l'OTA, et présente deux spots (figure 105). Les deux adduits Z1 ; Z2 sont formés dès deux heures (2h) d'exposition.

Ceci est en accord avec d'autres travaux sur la génotoxicité de la ZEA. La ZEA forme des adduits à l'ADN dans le foie et le rein de souris Balb/C identifiés par la méthode de post-marquage au P<sup>32</sup> (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1995 ; Grosse *et al.*, 1997). La ZEA induit la fragmentation de l'ADN et la formation de micronoyaux dans les cellules de DOK (lignée cellulaire humaine établie à partir de dysplasie muqueuse buccale), les cellules de rein de singe (Vero) et les cellules Caco-2 (humaine intestinales) (Abid-Essefi *et al.*, 2003 ; 2004), ainsi que dans les cellules de moelle osseuse de souris (Ouanès *et al.*, 2003). Elle induit des échanges de chromatides sœurs, des aberrations chromosomiques, et la polyploïdie dans les cellules ovariennes de hamster chinois (Creppy *et al.*, 2002 ; Zinedine *et al.*, 2007). Il a été montré que la ZEA cible la mitochondrie et / ou les lysosomes, induit la peroxydation des lipides, la mort des cellules et inhibe les synthèses protéiques et de l'ADN (Kouadio *et al.*, 2005).

### 1.2.2.2 Coexposition des cellules HK2 à l'OTA et à la ZEA

Les cellules rénales humaines HK2 ont été traitées simultanément par l'OTA et la ZEA. Les profils ci-dessous correspondent à l'exposition des cellules pendant 7h aux toxines. Les proportions d'OTA et de ZEA sont variables.

Il est à noter que seul un des adduits de l'OTA a été observé. Après 7 heures d'exposition des cellules HK2 à 0,1  $\mu$ M d'OTA et deux concentrations de ZEA (5 nM et 10 nM), on n'observe que l'adduit spécifique de l'OTA correspondant au C-C8 dG-OTA (figure 106). L'adduit s'amplifie lorsque la concentration en ZEA augmente (2 fois plus de ZEA).

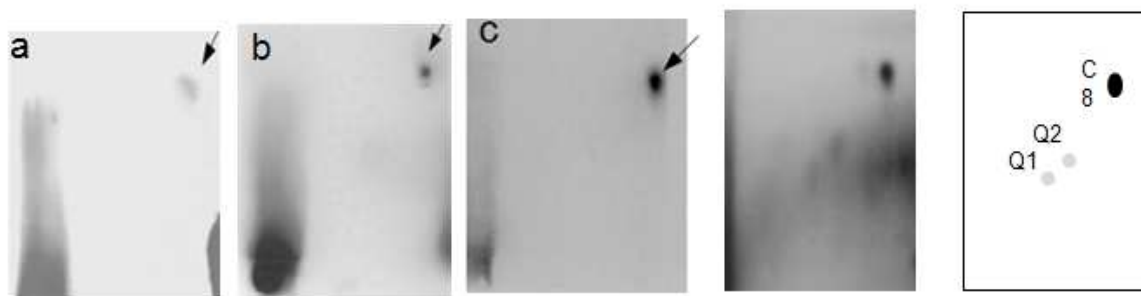


Figure 106 : Formation d'adduit à l'ADN des cellules rénales humaines coexposées à l'OTA et la ZEA  
a- traitement 7 heures 0,1  $\mu$ M OTA et 5nM ZEA. b- traitement 7 heures 0,1  $\mu$ M OTA et 10nM ZEA.  
c- C-C8dG- OTA.: adduit standard. d- traitement 24h OTA seule.

Lorsque les cellules HK2 sont exposées à 5 fois plus d'OTA (0,5  $\mu$ M) en présence de ZEA (10nM et 25 nM), on note l'amplification de l'adduit principal (C-C8) de l'OTA proportionnellement à l'augmentation de la concentration de ZEA (figure 107). Cette augmentation est d'autant plus importante que la quantité de ZEA augmente.

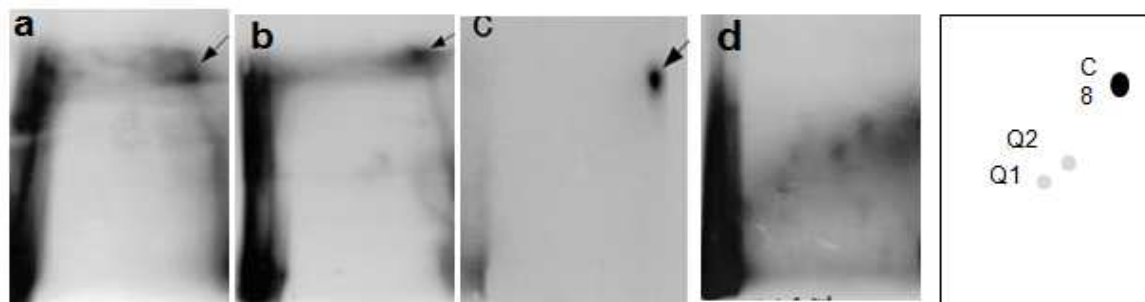


Figure 107 : Formation d'adduit à l'ADN des cellules rénales humaines coexposées à l'OTA et la ZEA  
a-OTA traitement 7 heures 0,5  $\mu$ M OTA et 10 nM ZEA. b- traitement 7 heures 0,5  $\mu$ M OTA et 25 nM ZEA.  
c- C-C8dG- OTA.: adduit standard. d- adduit standard spécifiques de l'OTHQ sur les cellules

La ZEA agit en synergie vis-à-vis de la génotoxicité de l'OTA. La co-exposition aux deux toxines inhibe la formation des adduits du à la ZEA, puisque seul persiste le C-C8 dG-OTA. Ceci confirme les résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont montré que la ZEA est génotoxique, et induit des adduits à l'ADN dans des cultures de lymphocytes bovines (Lioi *et al.*, 2004). Il a été observé une augmentation significative des aberrations chromosomiques (AC) et les échanges de chromatides sœurs (ECS) associée à une réduction de la l'index mitotique (IM) dans toutes les cultures de lymphocytes bovines traités par l'OTA et la ZEA.

Dans notre étude, la ZEA à 0,5  $\mu$ M n'a aucun effet sur la viabilité des cellules rénales humaines (HK2) à 24h. Par contre pour cette même concentration de ZEA, l'analyse des adduits a permis de visualiser 2 adduits à l'ADN dès 2h d'exposition des HK2.

Lorsque les cellules HK2 sont traitées par les deux toxines (OTA plus ZEA) simultanément (5nM à 1  $\mu$ M), nous avons remarqué une légère prolifération à 24h avec le test de MTS (viabilité cellulaire). L'analyse des adduits (par post-marquage au P<sup>32</sup>) de la combinaison (OTA plus ZEA) à des

concentrations croissantes d'OTA ou de ZEA a permis de noter une amplification de l'adduit spécifique de l'OTA (C-C8 dG-OTA) avec l'augmentation de l'OTA ou de la ZEA.

Cela nous permet d'attirer l'attention sur le fait que des concentrations n'ayant pas ou peu d'effet sur la viabilité cellulaire, peuvent avoir des effets drastiques du point de vue génotoxique.

## 2. Etude des mécanismes d'action impliqués dans la toxicité et génotoxicité des mycotoxines

Plusieurs mécanismes ont été impliqués dans l'induction de la mort des cellules par l'OTA, y compris la perturbation de l'ADN mitochondrial de la chaîne respiratoire, des troubles de l'équilibre entre protéines pro-et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, l'activation des MAPK, diminution de l'ATP intracellulaire, augmentation du calcium intracellulaire ainsi que le stress oxydatif (Eder *et al.*, 2000; Schwerdt *et al.*, 2004; Assaf *et al.*, 2004; Gekle *et al.*, 2005; Kamp *et al.*, 2005). L'OTA provoque à la fois la mort cellulaire par apoptose et nécrose des cellules rénales. Les mécanismes invoqués peuvent être le stress oxydatif (Klaric *et al.*, 2008) et l'inhibition de certains transporteurs. (Schramek *et al.*, 1997 ; Gekle *et al.*, 2000 ; Sauvante *et al.*, 2005). Néanmoins, la différence de réponse entre les lignées cellulaires ne peut pas être expliquée par ces seuls phénomènes. Il semble que la différence de susceptibilité entre sexe (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1998 ; 2002) et les différences d'organes cibles (rein *versus* foie) (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993) soient dues à une différence de métabolisation (Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2008). Dans une étude précédente faite par notre équipe, il avait été montré que les métabolites ne présentaient ni la même potentialité cytotoxique, ni la même potentialité génotoxique (Faucet *et al.*, 2006). Pour cela nous avons réalisée une étude comparative avec des métabolites se formant chez les animaux ou dans les cellules.

### 2.1 Relation-structure -activité de l'OTA

Nous avons testé l'effet relation structure-activité de l'OTA et certains de ses dérivés (figure 108) obtenus après substitution du chlore dans son carbone C5. Le but est d'étudier le rôle de l'atome de chlore en position C5 dans la cytotoxicité et la génotoxicité de l'OTA. Nous avons exposé les cellules épithéliales bronchiques humaines (WI26) et les cellules épithéliales de rein opossum (OK) à l'OTA et aux dérivés ayant un substituant différent au niveau du C5 (figure 108). La viabilité cellulaire et l'impact sur l'ADN ont été évalués. Pour cela nous avons comparé la capacité de l'OTA, l'OTBr (OTA dans laquelle le chlore est substitué par un brome), l'OTB (forme déchlorée de l'OTA) et l'OTHQ (forme quinone) à réagir par photoréaction avec le glutathion (GSH) ou la 2' désoxyguanosine (dG).

L'OTA, l'OTBr, et l'OTHQ réagissent de manière covalente avec le GSH et le dG suite à la photoirradiation, alors que l'OTB (forme déchlorée) ne réagit ni avec le GSH ni avec le dG. Ces résultats sont corrélés à leur capacité à former des adduits covalents à l'ADN (génotoxique direct) dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (WI 26) et les cellules rénales humaines (HK2) évalués par la technique du post-marquage au P<sup>32</sup>. L'OTB n'est pas un génotoxique direct, contrairement à l'OTA, l'OTBr, et l'OTHQ. A l'inverse leur cytotoxicité dans les cellules rénales et les cellules pulmonaires n'est pas corrélée à la photoréactivité. L'OTA, l'OTBr, et l'OTB sont cytotoxiques pour les deux types cellulaires, alors que l'OTHQ ne l'est pas. Ceci indique clairement que l'atome de chlore en position C5 est critique pour la génotoxicité mais joue un rôle moins important dans la cytotoxicité. Ceci confirme que le mécanisme d'action à l'origine de la génotoxicité est différent de celui entraînant la cytotoxicité, et permet d'affirmer que le mécanisme de carcinogénicité passe par la formation d'adduits covalents à l'ADN engendrant de la mutagénicité, alors que la néphrotoxicité est le résultat d'un effet cytotoxique, comme nous l'avons montré dans notre étude de carcinogénicité (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces résultats est décrit dans l'article: Structure-Activity Relationships Imply Different Mechanisms of Action for Ochratoxin A-Mediated Cytotoxicity and Genotoxicity. **Kheira Hadjeba-Medjdoub**, Mariana Tozlovanu, Annie Pfohl-Leszkowicz, Christine Frenette, Robert J. Paugh, and Richard A. Manderville. Chemical Research in Toxicology (voir annexe 2).

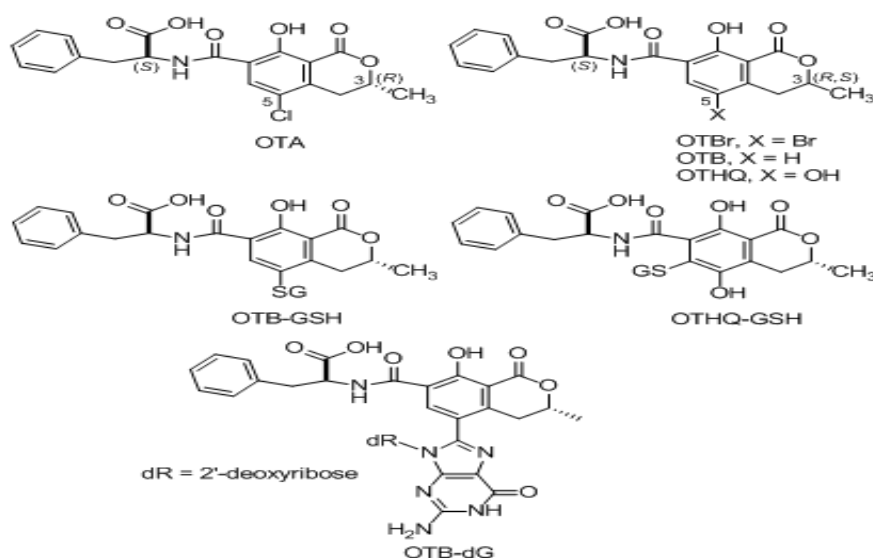


Figure 108 : Structure chimique de l'OTA et de certains de ses dérivés.

Nos résultats confortent ceux obtenus par Malaveille *et al.* 1991 et 1994 ainsi que ceux de Xiao *et al.*, 1995, 1996 a, b ; Pfohl-Leszkowicz, 1999). Xiao *et al.* (1995) ont synthétisé chimiquement 5 analogues structuraux de l'OTA et entrepris une série d'étude de relation structure-activité toxique *in vitro* chez *Bacillus brevis* et dans des cellules HeLa, et *in vivo* chez le rat et la souris (Xiao *et al.*, 1996 a, et b). Ils en ont déduit que la présence (par ordre décroissant) des groupements carboxyle (de la phénylalanine), chloro (en C<sub>5</sub>) et hydroxyle (en C<sub>8</sub>) favorisaient la toxicité *in vitro* et *in vivo* de l'OTA sans pour autant être essentiels à sa manifestation. Contrairement à Rahimtula *et al.* (1988), ils estiment que la toxicité de l'OTA n'est pas corrélée à sa capacité à chélater l'ion Fe<sup>2+</sup> et que, par ailleurs, c'est le groupement carboxyle de la Phe qui est responsable de la formation du chélate. Xiao *et al.* (1996 a et b, 1997 a et b) ont confirmé que des radicaux hydroxyles étaient produits à partir des différents métabolites d'OTA par les microsomes en présence de NADPH, sans adjonction de fer exogène. Cette formation de radical libre peut être inhibée par la catalase. Malaveille *et al.* (1991 et 1994) estiment que la toxicité de l'OTA serait due à un radical alkoxy en C<sub>8</sub> et un dérivé thiol issu de la conjugaison au glutathion. Xiao *et al.* (1996 b) supposent plutôt que le groupement phénylalaninyl- permet à l'OTA d'être guidée vers les cibles cellulaires (ce qui expliquerait le peu de toxicité de l'OTα). Seul le groupement isocoumarinique serait responsable de la toxicité *via* la formation d'une forme ouverte de l'OTA (OP-OTA) à la suite de l'hydrolyse de la fonction lactone dans certaines conditions physiologiques. Ces auteurs constatent que, dans la bile de rats traités par l'OTA (mais pas dans l'urine ou le sang), environ 50 % de cette OTA est de l'OP-OTA et que cette forme ouverte est encore plus toxique que l'OTA chez cet animal. Ils ont même constaté (Xiao *et al.*, 1996 a) que l'OTA se liait aux macromolécules biologiques par une liaison ester covalente impliquant le groupement carbonyle de cette fonction lactone et concluent que cette liaison, serait responsable de la toxicité et la génotoxicité de l'OTA qui se lierait respectivement aux protéines enzymatiques et acides nucléiques.

## 2.2 Impact des mycotoxines OTA et/ou FB1 sur la cascade de l'acide arachidonique et des Mapk

Stockmann-Juvala *et al.* (2004, 2006) ont suggéré que l'activation de caspase-3 pourrait être un des éléments déclencheurs qui mène à la production de ROS accrue et à la peroxydation lipidique et à la diminution du niveau du GSH dans les cellules exposées à la FB<sub>1</sub>. La FB<sub>1</sub> et l'OTA activent la caspase-3 et induisent l'apoptose dans de nombreuses lignées cellulaires d'origine humaine et animale (Rumora *et al.*, 2002 ; Gopee *et al.*, 2003 ; Stockmann-Juvala *et al.*, 2006 ; Schwerdet *et al.*, 1999 ; Rached *et al.*, 2006). Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans l'apoptose stimulée par la FB<sub>1</sub> tels que l'inhibition de la céramide synthase avec accumulation des bases sphingoides, répression de la protéine kinase C et ses précurseurs NF-κB et TNF, ainsi que la mobilisation du calcium



cellulaire (Kim *et al.*, 2001 ; Gopee *et al.*, 2003). L'effet de la FB<sub>1</sub> sur la cascade de l'acide arachidonique (AA) et la voie de transduction du signal de régulation de l'enzyme phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) a été étudié dans une lignée bronchique humaine (WI) (Pinelli *et al.*, 1999). Il a été observé que la FB<sub>1</sub> stimule l'activité de la phospholipase cytoplasmique (cPLA<sub>2</sub>) et augmente la libération de l'acide arachidonique (AA) par un mécanisme indépendant de l'activation de la protéine kinase (PKC). L'activation de cPLA<sub>2</sub> est un processus en deux étapes. La première est la phosphorylation de la protéine kinase mitogène (MAPK : mitogene-activated protein kinase) par cPLA<sub>2</sub>, le second est une conséquence de l'augmentation de la sphingosine à l'intérieur et à l'extérieur des cellules après 2 h, ce qui est connu pour induire une augmentation du calcium intracellulaire libre. Globalement, cela a suggéré que l'effet de la FB<sub>1</sub> sur les cellules est dépendant de l'action de la FB<sub>1</sub> sur les enzymes impliquées dans le cycle cellulaire, comme les MAPK et la PKA, et sur la synthèse des acides gras bioactifs, tels que les prostaglandines et les leucotriènes, ainsi que sur les perturbations du métabolisme des sphingolipides (Pinelli *et al.*, 1999).

Sauvant et son équipe (1998) ont montré que l'OTA réduit l'activité du transporteur d'anions organiques, sans influencer la fonction des cellules rénales d'opossum (OK) en général. L'OTA semble agir préférentiellement sur le transport des anions organiques, en affectant l'échange d'anions organiques et les dicarboxylates. Ainsi, l'OTA réduit sa propre excrétion. L'excrétion d'autres xénobiotiques et des médicaments peut aussi être altérée, car l'OTA peut exercer une action toxique indirecte en retardant l'élimination d'autres substances (Sauvant *et al.*, 1998).

La sécrétion trans-épithéliale d'anions organiques peut être régulée en deux sites: au niveau de l'absorption basolatérale et au niveau de l'efflux apical. Ces deux étapes sont sous le contrôle de la protéine kinase C (PKC) et la MAPK (mitogen-activated protein kinase). Les protéines ERK1/2 sont des kinases, font partie de la famille des MAP kinases qui sont des protéines jouant un rôle dans la division, la croissance et la prolifération cellulaires. Il a été montré que, dans la lignée cellulaire rénale d'opossum, le facteur de croissance épithélial (EGF) stimule le transport basolatéral des anions organiques (OAT) *via* ERK1/2, l'acide arachidonique, la phospholipase A<sub>2</sub>, et la synthèse des prostaglandines. Le PGE<sub>2</sub> se lie au récepteur des prostanoïdes et, par conséquent, active adénylate cyclase et la PKA (protéine kinase A), qui stimulent l'absorption basolatérale des anions organiques. (Sauvant *et al.*, 2004).

C'est la raison pour laquelle nous avons étudié ces mécanismes en exposant simultanément les cellules aux deux toxines

Nous avons évalué l'effet des mycotoxines seule ou combiné (OTA et/ou FB<sub>1</sub>) dans les cellules rénales humaines HK2. Plusieurs paramètres ont été étudié : la prolifération cellulaire, la cascade de l'acide arachidonique (AA), l'activation des protéines mitogène kinase (Mapk) et la détection des adduits à l'ADN.

Le traitement combiné à l'OTA et la FB<sub>1</sub> à une dose de 0,5 µM (500 ppb) stimule la prolifération cellulaire. Alors que dans ces conditions la FB<sub>1</sub> seule est faiblement cytotoxique tandis l'OTA seule n'a montré aucun impact sur la viabilité cellulaire des HK2.

Des adduits à l'ADN ont été observé après 2h de co-exposition des cellules HK2 à l'OTA et la FB<sub>1</sub> 0,5µM, alors que l'adduction de l'OTA seule est plus tardive (7h d'exposition).

La libération de l'AA par FB<sub>1</sub> a été inhibée par l'OTA, même si les taux de l'AA, les prostaglandines (PG) et les leucotriènes (LT) étaient plus élevés pour le mélange de toxine (OTA et FB<sub>1</sub>) que pour l'OTA seule. L'AA est un précurseur des prostaglandines (PG) et leucotriènes (LT) qui sont de puissants médiateurs lipidiques impliqués dans l'homéostasie de nombreux fonctions biologiques et de l'inflammation; une caractéristique commune de la promotion tumorale

Nous avons observé une augmentation synergique de l'activité MAPK. Les dommages néphrotoxiques dans les cellules rénales humaines sont plus importants avec l'exposition combinée de la FB<sub>1</sub> et l'OTA par rapport à chaque mycotoxine prise seule.

Les résultats obtenus sont détaillés dans l'article : Concerning the combined impact of fumonisin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in human kidney cells. **Kheira Hadjeba-Medjdoub**, Chakib El Adlouni, Richard A. Manderville & Annie Pfohl- Leszkowicz (voir annexe 3).

### 3. Effet sur les animaux

#### 3.1 OTA/FB<sub>1</sub> sur le rat

Les rats ont été traités par l'équipe du Pr Maja Peraica (Institut de santé publique, Zagreb, Croatie) dans le cadre d'une collaboration.

Des rats males (wistar) pesant 190g ont été exposés pendant 15 jours. L'exposition des rats aux mycotoxines a été effectuée par voie orale (1 gavage/ jour) avec de l'ochratoxine A et/ou de la FB<sub>1</sub>. Chaque groupe est constitué de 6 animaux. Les différents traitements sont les suivants :

Un groupe d'animaux témoins négatifs "contrôles" n'ayant subi aucun traitement, et ont reçu l'eau distillée ;

Deux groupes d'animaux ont été traités par l'OTA seule (5 ng/kg ; et 50 µg/kg de poids corporel (pc)) pendant 15 jours ; Deux groupes d'animaux ont été traités par la FB<sub>1</sub> seule (200 ng/kg pc ; et 50µ/kg pc) pendant 5 jours ; Trois groupes d'animaux ont reçu les deux toxines. Les animaux ont d'abord été traités par l'OTA pendant 15 jours puis ont reçu la FB<sub>1</sub> durant les 5 derniers jours.

5 ng OTA/kg pc+ 200 ng FB<sub>1</sub>/kg p.c

5 ng OTA/kg pc+ 50 µg FB<sub>1</sub>/kg p.c

50µg OTA/kg pc + 50 µg FB<sub>1</sub>/kg p.c

Vingt quatre heures après le dernier traitement, ces animaux ont été sacrifiés et les reins ont été prélevés et conservés à - 80°C. Ces échantillons ont été utilisés pour l'étude de la formation d'adduits.

L'exposition à des doses très faibles d'OTA 5ng/kg de poids corporel/jour entraîne la formation de plusieurs adduits caractéristiques de l'OTA (figure 109). Cette dose est pourtant considérée comme n'ayant aucun effet puisqu'il s'agit de la dose journalière tolérable, sensée protégée des effets cancérogènes.

Nous avons évalué l'effet génotoxique en mesurant le taux d'adduits à l'ADN dans les reins. Le taux total d'adduit est présenté dans la figure 109.

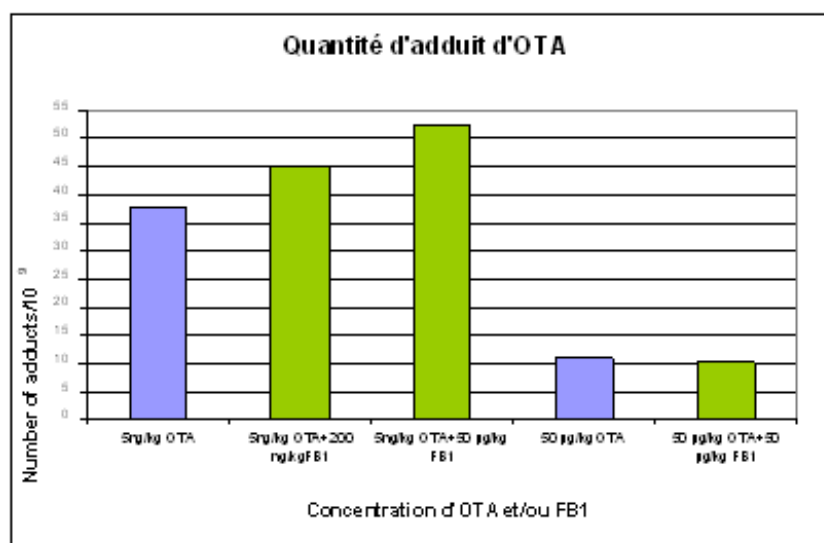


Figure 109 : Effet génotoxique d'une co- contamination en OTA et FB<sub>1</sub> sur des reins de rat

Quand les animaux sont exposés simultanément à des doses de FB<sub>1</sub> et d'OTA (5ng/kg OTA plus 200 ng/kg FB<sub>1</sub>) et (5ng/kg OTA plus 50µg/kg FB<sub>1</sub>), l'effet génotoxique de la combinaison (OTA plus FB<sub>1</sub>) est plus important que celui généré par l'OTA seule. Nous observons respectivement 37 adduits/10<sup>9</sup> nucléotides *versus* 45 adduits/10<sup>9</sup> nucléotides et 37adduits/10<sup>9</sup> nucléotides *versus* 52 adduits/10<sup>9</sup> nucléotides).

Il apparaît qu'à des concentrations équivalentes en OTA et FB<sub>1</sub> (50µg/kg OTA+ 50µg/kg FB<sub>1</sub>) le nombre d'adduit (10 adduits/10<sup>9</sup> nucléotides) est comparable aux animaux exposés à 50µg/kg OTA seule (11 adduits/10<sup>9</sup> nucléotides).

La FB<sub>1</sub> n'est pas génotoxique par elle-même, par contre, elle amplifie la génotoxicité de l'OTA, notamment l'adduit C-C8 dG OTA. L'amplification augmente avec le taux de FB<sub>1</sub> lorsque le traitement d'OTA a été réalisé avec la petite dose d'OTA (5 ng/kg pc).

Une exposition des animaux à des doses d'OTA (50µg/kg pc) soit 10000 fois plus élevée que la dose de 5ng/kg pc ne se solde pas par un taux plus élevé d'adduit, au contraire, il y en a moins. Ceci s'explique par le fait qu'à cette dose là, l'effet cytotoxique de l'OTA prend le dessus par rapport à l'effet génotoxique (Tozlovanu *et al.*, 2006). Dans ce cas là la présence de FB<sub>1</sub> n'augmente pas le taux d'adduits ; mais n'améliore pas non plus la cytotoxicité.

Les animaux (rats Wistar) sur lesquels, nous avons analysé les adduits à l'ADN dans leurs reins, ont été utilisés par l'équipe collaboratrice de Domijan (2006) pour l'étude de la génotoxicité par une autre méthode. Domijan *et al.* (2006) ont étudié les dommages à l'ADN provoqués par ces mycotoxines seules ou en combinaison (OTA, FB<sub>1</sub> et OTA plus FB<sub>1</sub>) en utilisant le test des comètes standard en conditions alcalines (cassures à l'ADN) et le test modifié (dommages à l'ADN total).

Dans la cellule, l'ADN est sous forme surenroulée et double-brins. Dans des conditions alcalines : il se produit le déroulement de l'ADN et la libération des fragments d'ADN ainsi la détection des coupures simple- et double-brins. La méthode des comètes permet d'évaluer le degré de cassure de l'ADN (simple brin). La différence de dommages à l'ADN mesurée entre le test comète standard et le test modifié indique la présence de 8-oxodG (8-Oxo-2'-désoxyguanosine) résultant de dommages oxydatifs de l'ADN. La 8-oxo-désoxyguanosine (8-oxo-dG ou 8- OH dG) (voir figure 110) est la lésion principale causée à l'ADN par le stress oxydatif, principalement les oxygène-singulet et le radical hydroxyle. La 8-oxo-dGuo provient de l'autooxydation de la guanosine.

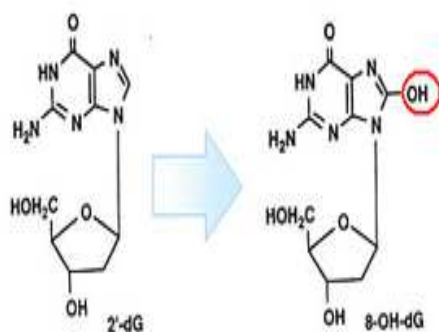


Figure 110 : Formation de 8hydroxy 2-désoxyguanosine par des radicaux oxygénés

La longueur et l'intensité de la queue de la comète, l'OTM (Olive tail moment= longueur X % d'ADN dans la queue) sont significativement plus élevés chez les animaux traités que chez les témoins, même avec les concentrations les plus faibles d'OTA ou FB<sub>1</sub> (p <0,01) considérées comme n'ayant pas d'effet. Le test des comètes modifié a montré une plus grande longueur et intensité de la queue et l'OTM de façon significative, dans tous les animaux traités que le test des comètes standard (p <0,05), ce qui suggère que le stress oxydatif est susceptible d'être responsable de dommages à l'ADN.

Il a été conclu que l'OTA et FB<sub>1</sub> induisent la formation du 8-oxodG *in vivo*, fournissant des preuves sans équivoque de dommages oxydatifs de l'ADN. Le stress oxydatif est impliqué dans le développement des dommages à l'ADN causés par les deux mycotoxines (OTA et FB<sub>1</sub>), mais ce mécanisme n'est pas le seul responsable. L'augmentation dans l'intensité de la queue et l'OTM dans les animaux traités avec les 2 mycotoxines simultanément, est beaucoup plus élevé qu'avec chaque mycotoxine seule, ce qui montre que leur contribution d'endommager l'ADN est synergique, même à des doses qui correspondent à l'exposition quotidienne de l'homme en Europe (Domijan *et al.*, 2006). L'ensemble de ces résultats indiquent clairement qu'il y a deux types d'altération de l'ADN qui se produisent avec ces deux toxines (OTA et FB<sub>1</sub>) : des dommages oxydatifs et des adduits covalents.

### 3.2 OTA/FB1 sur le porc

Nous avons étudié l'effet de l'OTA et de FB<sub>1</sub> sur les porcs mâle et femelle dont l'alimentation a été contaminée en OTA et/ou FB<sub>1</sub>. 4 groupes d'animaux ont été désignés et traités comme suit :

Lot 1 : Les porcs ont ingéré de la nourriture (maïs) contaminée en FB<sub>1</sub> à 15 µg/kg pc/jour pendant 36 jours ; Lot 2 : Les porcs ont ingéré de la nourriture contaminée en OTA à 20 µg/kg pc/jour ; Lot 3 : Les porcs ont ingéré de la nourriture contaminée par les 2 toxines de manière à ingérer 15 µg/kg pc/j d'FB<sub>1</sub> et 20 µg/kg pc/j d'OTA pendant 36 jours ; Lot 4 : les porcs ont ingéré une nourriture sans mycotoxine.

A la fin du traitement, les animaux ont été sacrifiés. Les adduits à l'ADN ont été recherchés dans les reins. Les profils des adduits sont présentés dans la figure 111.

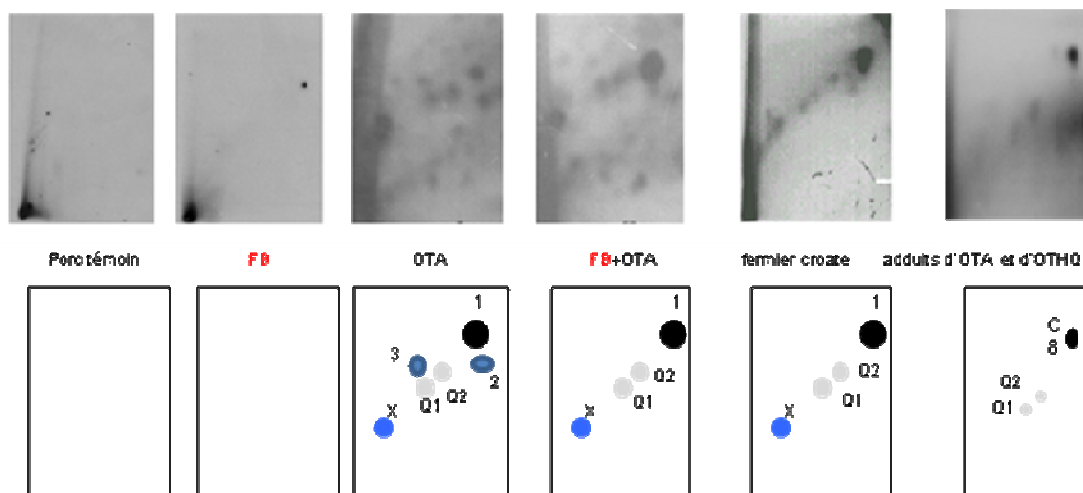


Figure 111 : Autoradiogrammes des adduits dans les reins de porcs.

Dans les reins d'animaux témoins aucun adduit n'est détecté. Aucun adduit non plus n'est généré dans les reins des animaux traités avec la FB<sub>1</sub> seule (15 µg/kg pc/jour), confirmant que la FB<sub>1</sub> n'est pas génotoxique.

Lors du traitement des animaux avec de l'OTA (20 µg/kg pc/jour), une dizaine d'adduits ont été détectés, notamment l'adduit principal C-C8 OTA-dG et ceux obtenus avec l'OTHQ (adduit Q1 et Q2).

Lorsque les animaux sont traités simultanément avec les deux toxines FB<sub>1</sub> et OTA (15 µg/kg pc/j et 20 µg/kg pc/j respectivement pendant 36 jours) plusieurs adduits sont observés. On note une augmentation significative de l'adduit principal (C-C8 OTA-dG).

Les profils d'adduits sont comparables à ceux retrouvés dans le rein de fermiers croates et bulgares ainsi que dans les organes des animaux de leurs fermes. Ces fermiers sont exposés *via* leur alimentation et leur environnement professionnel à une exposition à ces mêmes mycotoxines. Il a été retrouvé dans ces échantillons l'adduit principal de l'OTA (C-C8 OTA-dG) et ceux spécifiques de l'OTHQ (adduit Q1 et Q2).

Au cours de notre étude de génotoxicité, nous avons constaté que la co-exposition des cellules et des animaux à l'OTA en présence d'autres mycotoxines (CIT, FB, ZEA) module la génotoxicité de l'OTA. Certains adduits de l'OTA s'amplifient, notamment le C-C8 dG-OTA. En effet, le traitement des cellules rénales humaines HK2 et des animaux par l'OTA et la FB augmente l'adduit principal C-C8 OTA. D'autre part, la ZEA amplifie aussi l'adduction de l'OTA dans les cellules rénales humaines. Seul l'adduit C-C8 apparaît lorsque les cellules HK2 sont exposées à l'OTA et à la ZEA, alors que l'OTA seule sur ces mêmes cellules induit à la formation de l'adduit C-C8 et les adduits spécifiques de l'OTHQ (adduit 2 et 3).

Il est intéressant de noter que les adduits spécifiques observés dans les cultures cellulaires (HK2) sont similaires, de part leur propriétés chromatographiques, à ceux observés *in vivo* au niveau des reins de rats et du porc. Ces cellules sont donc un modèle assez sensible pour étudier les effets de ces toxines. Les animaux utilisés dans notre étude (rat et porc) représentent un bon modèle pour l'étude de la génotoxicité de l'OTA (Pfohl-Leschkowicz *et al.*, 1998). Des adduits spécifiques de l'OTA ont été détectés dès 1991 lors d'une étude animale (Pfohl-Leschkowicz *et al.*, 1991). Il a été montré que l'OTA induit une adduction au niveau de l'organe cible, le rein, chez le rat de manière dose-dépendante (Pfohl-Leschkowicz *et al.*, 1993b) et chez le porc (Petkova-Bocahrova *et al.*, 2003b). Nos résultats sur l'amplification de la génotoxicité de l'OTA en présence d'autres mycotoxines sont en adéquation avec d'autres travaux. En effet, la co-contamination OTA et CIT induit à la formation de certains adduits spécifiques de l'OTA et de la CIT, avec amplification de l'adduit principal de l'OTA (C-C8 OTA-dG) (Molinié, 2004 ; Pfohl-Leschkowicz *et al.*, 2008).

En 1993, ces adduits ont été détectés dans les tumeurs de Bulgares souffrant de néphropathie endémique des Balkans (Pfohl-Leschkowicz *et al.*, 1993b). Dans ces régions, il a été montré la relation entre la présence de l'OTA et la CIT dans l'alimentation et la présence de cette maladie (Vrabcheva *et al.*, 2000). D'autres travaux de la combinaison entre l'OTA (0,75 mg OTA/kg d'aliment) et la CIT (15mg/kg d'aliment) ont conclu, à une interaction additive entre les 2 toxines. La CIT potentialise les effets toxiques de l'OTA sur l'ultra structure rénale chez les lapins blancs de Nouvelle-Zélande. (Kumar *et al.*, 2007). Les effets génotoxiques sont liés en partie à la métabolisation des 2 molécules et de leur impact sur le système de métabolisation. Sabater et Vilar, en 1999, ont montré un effet mutagène aussi bien de l'OTA que de la CIT après activation par des hépatocytes. Il a été montré par notre équipe que la CIT et l'OTA induisent différemment, *in vitro*, l'expression des enzymes de la voie de l'acide arachidonique et de certains CYP. Il a été montré précédemment que la génotoxicité de l'OTA était liée au CYP2C9 (Pfohl-Leschkowicz *et al.*, 1998 ; El Adlouni *et al.*, 2000) mais également à la COX2 et à la LIPOX (Pinelli *et al.*, 1999a). La modulation de ces enzymes par des antioxydants, par exemples, modifie l'effet carcinogénique et génotoxique de l'OTA (Pfohl-Leschkowicz *et al.*, 2002, a).

Comme pour la CIT, la FB<sub>1</sub> module la métabolisation de l'OTA. En effet, la FB<sub>1</sub> induit la COX2 et la LIPOX, ainsi que certains CYPs connus pour être impliqués dans la métabolisation en adduit de l'OTA (Pinelli *et al.*, 1999 ; Poux *et al.*, 2000). Dans notre étude nous avons montré que la coexposition des cellules à l'OTA et à la FB il y avait un effet synergique vis-à-vis de la stimulation de la LIPOX, notamment ainsi que sur l'activation des MAPKs (ERK1/2) (Hadjeba-Medjdoub *et al.*, 2012 soumis)

Plusieurs études, notamment celles menées dans notre laboratoire, ont montré que la nature des adduits à l'ADN dus à l'OTA dépend de sa voie de métabolisation (El Adlouni *et al.*, 2000 ; Petkova-Bocharova *et al.*, 2003 ; Pfohl-Leschkowicz & Castegnaro, 2005 ; Tozlovanu, 2008). Une étude faite en collaboration avec le Pr Manderville indique qu'au moins un de ces adduits correspond au C-C8 dG-OTA et serait généré par la voie des quinones (Faucet *et al.*, 2004b ; Pfohl-Leschkowicz & Manderville, 2007 ; Manderville & Pfohl-Leschkowicz, 2008 ; Mantle *et al.*, 2010).

Lebrun et Follmann (2002) montrent un faible effet génotoxique généré par la CIT sur des cellules de rein de chien après 3 h d'exposition à la CIT pour une dose de 20 µM. On observe une variation de la réponse en fonction du modèle cellulaire utilisé, du temps et de la dose choisie. Des cellules épithéliales bronchiques humaines ont été traitées par des doses croissantes de CIT pendant 12h. Des adduits à l'ADN sont détectés uniquement pour les doses de 10 et 50 µM de CIT. Principalement, trois adduits sont mis en évidence après traitement avec chacune de ces doses. La quantité totale d'adduits est 1,5 fois plus élevée à 50µM qu'à 10µM (60 adduits/10<sup>9</sup> nucléotides à 50 µM et 40 adduit/ 10<sup>9</sup> nucléotides à 10 µM). La cinétique de formation des adduits a été suivie entre 2 et 72h, lors d'un traitement des cellules à la concentration la plus élevée (50µM). Les adduits se forment entre 4 et 8h, temps auquel ils atteignent 49 adduits par 10<sup>9</sup> nucléotides, ils augmentent jusqu'à 16h (86 adduits par 10<sup>9</sup> nucléotides) puis diminuent à partir de 24 h (27 et 8 adduits par 10<sup>9</sup> nucléotides à 24 et 48h respectivement). A 72 h, plus aucun adduit ne persiste. Dans cette même étude, les cellules épithéliales pulmonaires ont été traitées par de la (CIT 50 µM) et de l'OTA (10 µM) sur une période de 16h. Les deux toxines ont été ajoutées en même temps ou décalées de 2 h ou de 8h. Les profils d'adduits ne sont pas identiques quand les cellules sont d'abord incubées pendant 2 h par l'une ou l'autre des toxines. Il a été observé que les voies de métabolisation des 2 toxines en dérivés génotoxiques ne sont pas identiques. Ces résultats indiquent que la CIT et l'OTA n'agissent pas par le

même mécanisme d'action. Les analyses de la génotoxicité, de l'impact sur les enzymes de métabolisation et les métabolites formés confortent cette hypothèse (Molinié, 2004).

Molinié 2004 a remarqué que l'ingestion de CIT et/ou d'OTA, induit un effet génotoxique au niveau des reins des animaux (rats males *Dark Agouty*) Les adduits étaient similaires à ceux observés *in vitro*. Il y a modulation des adduits lorsque les 2 toxines sont présentes simultanément. Les adduits qui persistent ou qui s'amplifient avaient des propriétés chromatographiques similaires à ceux observés chez des humains souffrant de Néphropathie Endémique des Balkans. Dans l'étude de Molinié (2004), la CIT augmentait le volume urinaire excrété. Ceci a été expliqué par une interférence avec les transporteurs d'anions organiques (OAT). Ces transporteurs, exprimés au niveau des cellules rénales (Gstraunthaler, 1988) peuvent avoir comme substrat l'OTA (Gekle *et al.*, 1993) et la CIT (Brendt *et al.*, 1989). Jung *et al.*, (2001), ont montré que la CIT était un inhibiteur compétitif de l'absorption de l'OTA pour cette famille de transporteur. Cette famille de transporteur est inhibée par l'activation de la protéine kinase C (PKC) alors qu'elle est stimulée par la MAPK *via* la phospholipase A<sub>2</sub> et plus spécifiquement la PGE<sub>2</sub> dont la synthèse est privilégiée par la COX<sub>2</sub>. Cela met en avant un lien supplémentaire entre l'induction de la COX<sub>2</sub> et l'interférence d'absorption. Un autre transporteur important dans l'excrétion, notamment de l'OTA, est le MRP-2 (*multi-drug protéine-2*). En effet, l'OTA est absorbée au niveau hépatique et rénal par l'intermédiaire du transporteur OAT, mais est excrétée par le récepteur MRP-2 (Russel *et al.*, 2002 ; Leier *et al.*, 2000). Dans les cellules NIH/3T3, l'OTA pénètre par diffusion passive car elle ne possède pas de transporteur OAT, par contre elle est excrétée par la MRP-2 (Breuninger *et al.*, 1995 ; Paul *et al.*, 1996 ; Ito *et al.*, 1998).

## 4. Etude de terrain

### 4.1 Mycotoxines et la baisse de fertilité chez le chat

Depuis plusieurs années, des éleveurs et des propriétaires de chats et de chiens doivent faire face à des problèmes de santé dans leur élevage. Des éleveurs inquiets se sont regroupés puis adressés à nous pour identifier la cause de leurs problèmes. Ils ont recueilli un grand nombre de témoignages (plus de 70) ces dernières années sur les problèmes de santé de leurs animaux et les réponses données par les vétérinaires et fournisseurs de croquettes. Notre attention a été attirée par les symptômes communs qui reviennent systématiquement dans plusieurs élevages. Ces symptômes se résument à :

- Vomissements et diarrhées
- Troubles hépatiques
- Retard de croissance
- Perte de poids

- Problèmes de reproduction parmi lesquels mortalité néonatale, avortements, malformations des chatons. La figure 112 représente les photos de certains chats mal-formés obtenus auprès d'éleveurs.

- Déficiences immunitaires (septicémies, infections multiples à l'origine de mortalité)
- Troubles rénaux.
- Décès de chatons



Figure 112 : Photos des chatons malformés



Plusieurs causes ont été suspectées. Diverses analyses réalisées par ces éleveurs ont permis d'exclure les pistes infections, l'environnement, le lait maternisé, l'intoxication par des métaux lourds. La piste alimentaire par déduction et après élimination des autres pistes possibles a été retenue.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressé à la piste des mycotoxines, car les symptômes cités ressemblent aux troubles rencontrés lors d'ingestion d'alimentation contaminée par des mycotoxines.

Le but l'étude était de mettre en parallèle la présence de l'OTA, de la CIT, de la ZEA, de l'AFB<sub>1</sub>, des FBs, et du DON dans des croquettes de chat et dans des organes de chatons mort-nés, afin d'évaluer si l'exposition des chats aux mycotoxines peut être responsable des problèmes de santé rencontrés dans les élevages.

Nous disposons d'organes de chatons mort-nés obtenus auprès d'éleveurs (2 élevages différents) qui nous ont contactés afin de faire le suivi (contrôle de l'alimentation) dans leur élevage suite à des problèmes de santé et de reproduction (voir figure 113).

### ➤ *1er élevage*

Nous avons analysé les échantillons d'organes (foie et de rein) du chaton mort-né (chaton1) provenant du 1<sup>er</sup> élevage. La mère de ce chaton (chat 1) a eu une portée de plusieurs chatons malformés. Cette femelle était nourrie avec les croquettes analysées de la marque M.

Suite à un changement de nourriture (aliment O), des améliorations de santé des animaux, a été observé. Nous avons obtenu à ce moment le sang de la 1<sup>ère</sup> femelle (chat 1) et d'une autre femelle du même élevage (chat x) ayant eu des problèmes d'avortement avec la marque M.

Par la suite, de nouveaux problèmes de santé réapparaissent et nous obtenons à cette période le sang de la femelle porteuse (chat 3) ainsi que les organes (rein, foie et placenta) du chaton mort-né (chaton3).

### *Historique des chattes provenant du 1<sup>er</sup> élevage (chat 1, chat x et chat 3)*

- La chatte 1 (femelle) est née le 14/06/2002, a eu une portée de 4 chatons. Un jour avant la mise bas, une échographie a été effectuée. Il s'est avéré que seulement deux chatons étaient vivants. Au 66<sup>ème</sup> jour de portée, le chat 1 a subi une césarienne. Le chaton mort-né (chaton 1) dont nous avons analysé les organes (foie et rein1) provient de cette portée.
- La chatte x est née le 19/08/2005. Elle a eu une portée le 22 /09/2006 de 4 chatons dont :
  - 1 chaton a été euthanasié à l'âge de 13 jours à cause d'œdèmes aux membres du fait qu'il n'assimilait pas les aliments.
  - 1 chaton a développé de l'épilepsie et un syndrome cérébelleux
  - 1 chaton est décédé vers un an.La chatte x a été mise en saillie du 05 au 07 Mars 2008 avec un autre mâle. Elle semblait être gestante et avait pris 1000 g à 44 jours de gestation. Elle n'avait plus l'attitude d'une femelle gestante et a perdu du poids (900g). Elle a ensuite été remise en saillie du 04/05/2008 au 06/05/2008. Après le changement de nourriture, elle a finalement eu des petits début Juillet 2008.
- La chatte x et la chatte 1 ont été nourris avec des croquettes de la marque « M » puis de la marque O.
- La chatte 3 a commencé à avoir des contractions lundi 16/02/2009 enfin d'après midi mais malgré des contractions fortes et rapprochées, l'accouchement naturel n'était pas possible. Une césarienne a été pratiquée. Il y avait un seul chaton mort, sans malformations apparentes, d'un gros gabarit, dans les normes de la race élevée. Une autopsie sur ce chaton (chaton3) n'a décelé aucune anomalie. Les organes ont été prélevés pour la recherche des mycotoxines. La chatte 3 au moment du problème avait été nourrie avec la même marque « O » mais le lot était différent de celui utilisé pour l'alimentation du chat x et du chat 1.

## ➤ 2ème élevage

Nous avons eu à analyser les organes (cerveau, foie, rein et intestin) d'un autre chat malformé (chaton 2), provenant du 2<sup>ème</sup> élevage.

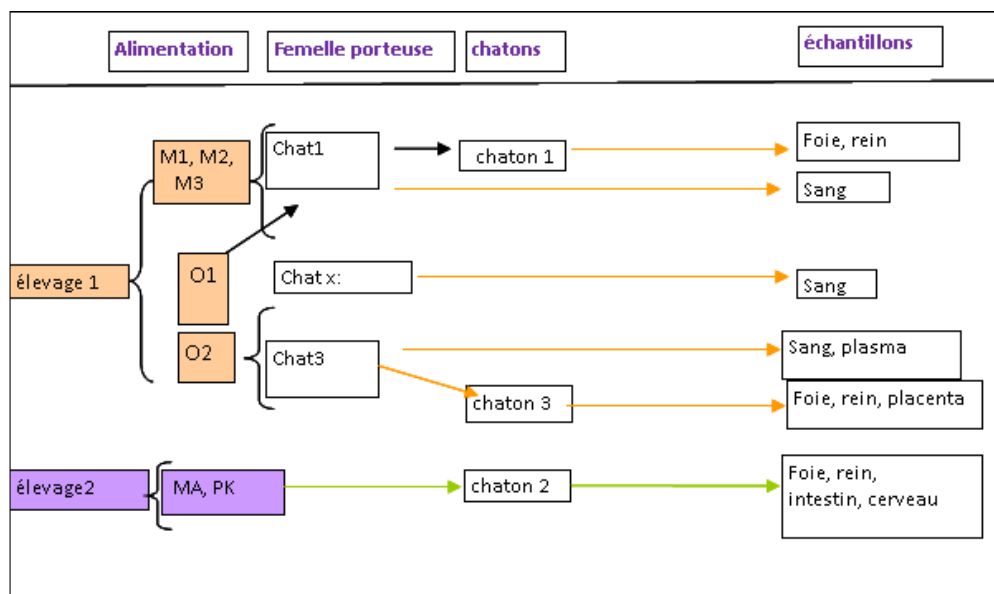


Figure 113 : Origine des échantillons analysés

### 4.1.1 Résultats du 1er élevage

Nous avons analysés les organes (foie et de rein) d'un chaton mort-né (chat 1). Les chattes de cet élevage étaient nourries avec les croquettes à base de poissons, volaille ou spécifique bébé (M1, M2 et M3). Elles n'avaient que peu de chatons et souvent non viables. Il ya vait une baisse de la conception et des malformations des fœtus (avortement, saillie infructueuse, chatons mort-né,...)

#### 4.1.1.1 Etape 1

##### 4.1.1.1.1 Analyse des mycotoxines dans les croquettes

Les résultats d'analyse des mycotoxines dans les 3 croquettes sont résumés dans le tableau 47.

Tableau 47 : Analyse des croquettes (aliments de la mère du chaton 1).

Echantillon	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>					Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>			
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	FB <sub>2</sub> (µg/kg)	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Autres AFB
M1	46,39	333,60	168,73	502,33	215	ND	0,17	1,32	G2, G1, B2
M2	57,56	156,20	69	225,2	219,5	0,94	0,74	1,87	G2, G1, B2
M3	56,61	102,95	41,61	144,56	361	1,24	ND	0,92	G2, G1, B2

Les 3 types de croquettes contiennent des mycotoxines y compris de l'AFB<sub>1</sub>. Les quantités de ZEA sont voisines de 50µg/kg. Cette valeur est 2 fois plus élevée que la quantité acceptable pour les aliments destinés aux nourrissons. Les céréales constituent une grande partie dans la constitution de ces croquettes, notamment le maïs, le soja, et les graines de lin (voir tableau 48).



Tableau 48 : Ingrédients des croquettes de la mère du chaton 1 provenant du 1<sup>er</sup> élevage

No.	Ingrédients
M1	Viandes et poissons déshydratés, <b>céréales</b> cuites, graisses animales, protéines de <b>maïs</b> , fibres végétales, œuf en poudre*, graines de <b>lin</b> , levure de bière, lait végétal maternisé, fructo-oligosaccharides, minéraux, taurine, vitamines et oligo-éléments. Avec antioxygènes : BHA, BHT. Contient un minimum de 60 % de viandes, poissons et œuf, soit 30 % minimum après déshydratation.
M2	Poissons (min. 14 %) et viandes déshydratés*, <b>céréales</b> cuites, graisses animales, protéines de <b>maïs</b> , œuf en poudre*, fibres végétales, graines de <b>lin</b> , DL-méthionine, sel marin, <b>soja</b> déshuilé, fructo-oligosaccharides, minéraux, taurine, vitamines et oligo-éléments. Avec antioxygènes : BHA, BHT. Contient un minimum de 55 % de poissons, viandes et œuf, soit 28 % minimum après déshydratation.
M3	viandes (min. 14% de volailles) et poissons déshydratés*, <b>céréales</b> cuites, graisses animales, protéines de <b>maïs</b> , œuf en poudre, fibres végétales, graines de <b>lin</b> , DL-méthionine, sel marin, <b>soja</b> déshuilé, fructo-oligosaccharides, minéraux, taurine, vitamines et oligo-éléments. Avec antioxygènes : BHA, BHT. Contient un minimum de 50 % de viandes, poissons et œufs, soit 28 % minimum après déshydratation.

#### 4.1.1.1.2 Analyse des mycotoxines dans les organes du chaton

Une partie de la FB et de l'OTA s'accumulent dans le foie et le rein du chaton1 (tableau 49). Bien que les croquettes contiennent de la ZEA, on n'en retrouve pas sous cette forme dans le foie et le rein. Il est probable qu'elle ait été métabolisée.

Tableau 49 : Analyse des organes du chaton 1

Echantillon	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>			
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Autres AFB
Foie chaton 1	ND	10,28	NA	0,92	ND	ND	B2
Rein chaton 1	ND	2,93	NA	1,32	ND	ND	G2, B2

L'analyse du profil chromatographique de l'AF montre la présence d'aflatoxine G<sub>2</sub> et B<sub>2</sub> dans le rein du chaton 1, ainsi que la présence de l'aflatoxine B<sub>2</sub> dans le foie du chaton 1 (figure 114).

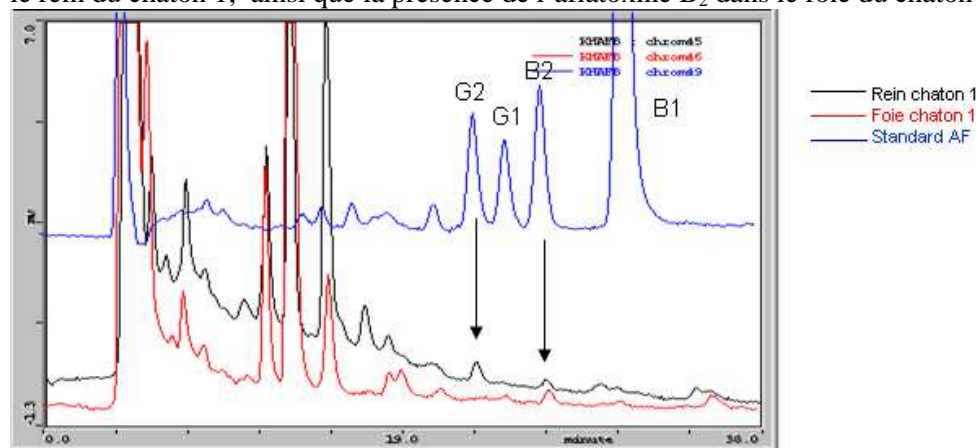


Figure 114 : Profil HPLC de séparation des aflatoxines dans les organes du chaton 1. (Rein en noir, foie en rouge et standard d'AF en bleu).

De même, on retrouve en plus de la FB<sub>1</sub> d'autres fumonisines que dans le foie et le rein du chaton 1 mort-né. Notamment il y a de la FB<sub>3</sub> et d'autres fumonisines que nous n'avons pas pu quantifier par manque des standards correspondants (figure 115).

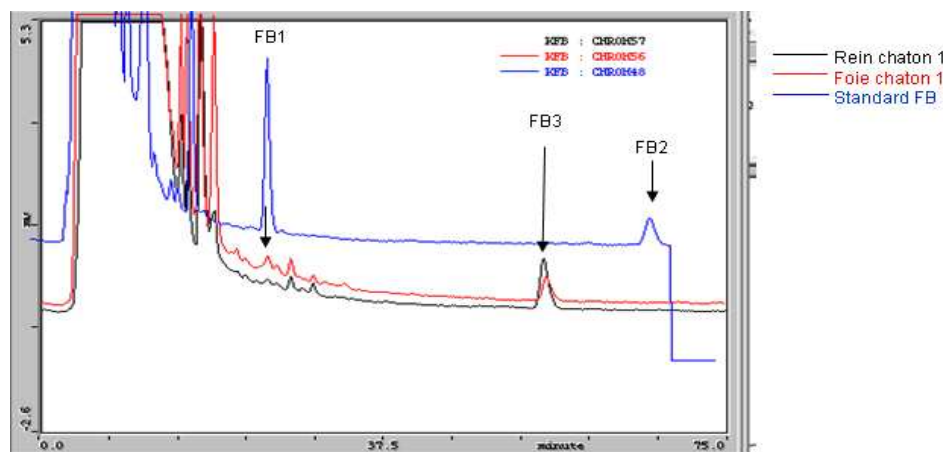


Figure 115 : Profil HPLC de séparation des fumonisines dans les organes du chaton 1. (Rein en noir, foie en rouge et standard de fumonisines en bleu).

Nous avons détecté non seulement de l'OTA mais aussi certains de ses dérivés dans les organes du chaton1 (figure 116).

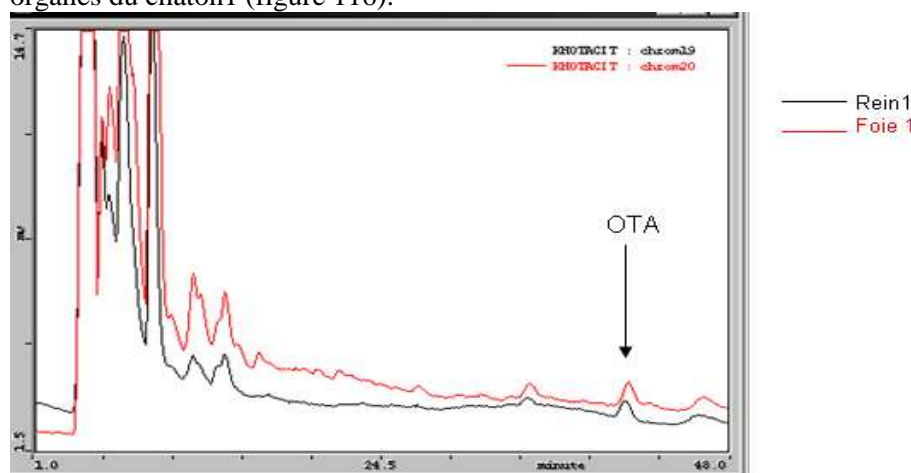


Figure 116 : Profil HPLC de séparation d'OTA dans les organes du chaton 1. (Rein en noir, foie en rouge)

#### 4.1.1.2 Etape2

##### 4.1.1.2.1 Analyse des mycotoxines dans les croquettes

Suite au changement de nourriture (M1, M2, M3) par la croquette (O1), des améliorations ont été observés, notamment, les chattes ont de nouveau eu des portés en bonne santé. Nous avons donc analysé les croquettes avec lesquelles étaient nourris les chattes mères ainsi que le sang de la chatte 1 et la chatte X qui se nourrissaient avec cette nouvelle croquette (O1). Les résultats sont présentés dans le tableau 50.

Tableau 50 : Analyse des croquettes (aliments du chat 1 et X).

Echantillon	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>			
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Autres AFB
O1	Dérivé	55,80	19,3 <LOQ	0,044	0,094	<LOD	G2, G1, B2

Ces croquettes sont nettement moins contaminées que les précédentes. L'analyse de l'aliment (O1) en question est de qualité nettement meilleure que les précédents (M1, M2 et M3). Il n'y a pas de ZEA et les concentrations en CIT et en AFB<sub>1</sub> sont beaucoup moins importantes. Le taux d'OTA retrouvé dans la croquette O1 est de 20 fois moins important que dans les autres croquettes (M1, M2 et M3). Le taux de FB<sub>1</sub> est de 3,5 fois moins important que dans les croquettes (M1, M2 et M3). Contrairement aux croquettes de la marque M, qui contenaient beaucoup de céréales, cette nouvelle croquette (O1) est constituée essentiellement d'ingrédients d'origine animale et d'autres végétaux (voir tableau 51), néanmoins, nous retrouvons les graines de lin et de la luzerne séchée. Ces 2 derniers pourraient être à l'origine de la présence des mycotoxines.

Tableau 51 : Ingrédients de la nouvelle du 1<sup>er</sup> élevage

No.	Ingrédients
O1	Viande fraîche de poulet, viande de poulet déshydratée (pauvre en cendres), viande de dinde déshydratée, pommes de terre rouges à l'étuvée, poisson fraîchement pêché ( <i>coregonus clupeaformis</i> ), graisse de poulet, oeufs frais, farine de saumon, huiles de saumon et de sardines, tapioca, bouillon de volaille, huile de tournesol, graines de -lin, fucus de l'Atlantique, carottes à l'étuvée, épinards, petits pois et tomates, luzerne séchée au soleil, fibres de pomme, graines de psyllium, extrait de romarin, chicorée, racines de bardane et de guimauve, extrait de levure, glucosamine HCl, aïrelles, groseilles, cynorrhodon, orties, fleurs de calendula, L-carnitine, graines de fenouil, fleurs de camomille, chardon, mouron des oiseaux, sarriette, sulfate de chondroïtine, vitamine E, chlorure de choline, vitamine A, vitamine D3, vitamine B3, vitamine B2, vitamine B1, vitamine K2, vitamine B12, vitamine B9, vitamine B7, vitamine B6, protéinate de fer, protéinate de zinc, sélénite de sodium, protéinate de manganèse, protéinate de cuivre, lactobacillus acidophilus, lactobacillus casei, B. bifidus, levure ( <i>S. boulardii</i> ). Les croquettes pour chats Orijen ne contiennent aucun conservateur artificiel.

#### 4.1.1.2.2 Analyse des mycotines dans le sang

Aucune des mycotoxines recherchées n'a été retrouvée dans les deux échantillons de sang des femelles «chat 1 et chat X» (tableau 52). Par contre, certains métabolites ont été retrouvés notamment ceux d'OTA (figure 117).

Tableau 52 : Analyse du sang du chat 1 et chat X.

Echantillon	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>			
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Autres AFB
Sang chat 1(mère)	ND	ND	NA	ND	ND	ND	B2
Sang chat X (mère)	ND	ND	NA	ND	ND	ND	B2

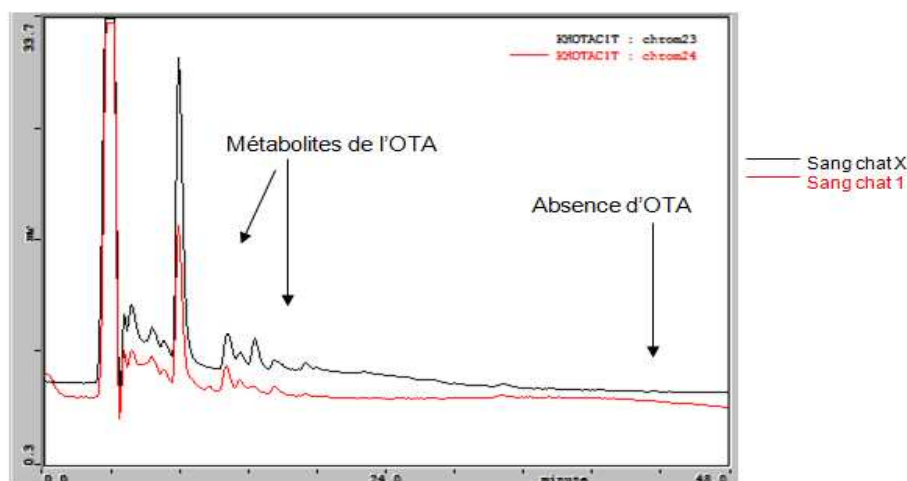


Figure 117 : Profil HPLC de séparation de l'OTA et ses métabolites dans le sang du chat 1(en rose), le chat x (en bleu), le foie 1 en (rouge) et rein 1 (en noir).

Dans le sang de ces deux chattes, nous observons de l'aflatoxine B<sub>2</sub> qui peut provenir soit de la présence de AFB<sub>2</sub> dans l'aliment soit provient de la métabolisation de l'AFB<sub>1</sub> (figure 118).

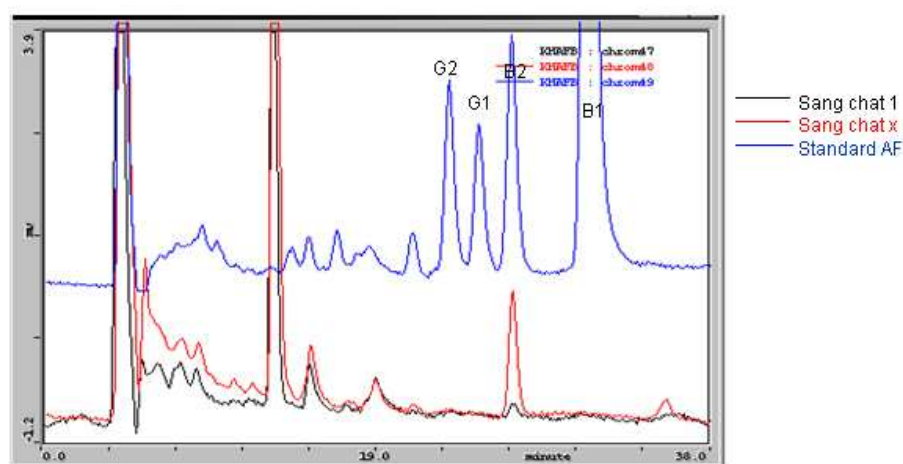


Figure 118 : Profil HPLC de séparation des aflatoxines dans le sang du chat 1(en noir) et le chat x (en rouge)

L'analyse des métabolites de fumonisine montre que dans le sang des 2 chattes mères (chat 1 et chat x), on observe des dérivés de FB (figure 119).

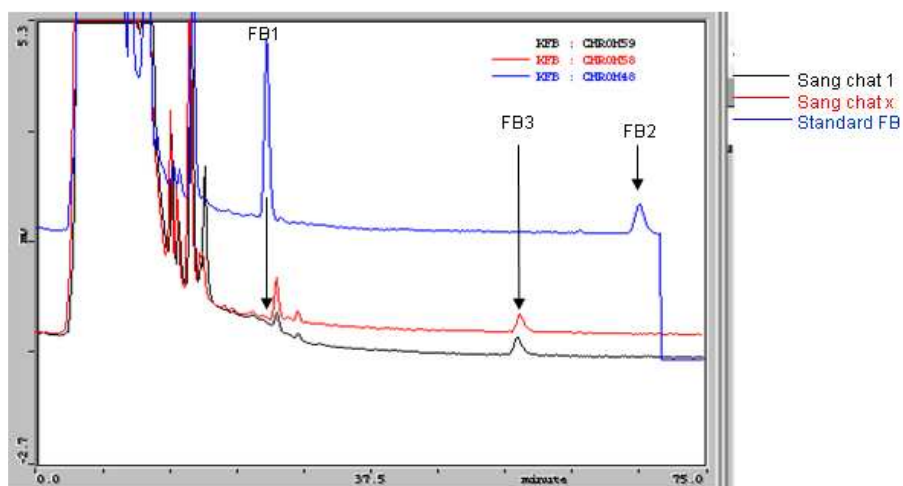


Figure 119 : Profil HPLC de séparation des fumonisines dans le sang du chat 1(en noir) et le chat x (en rouge).

#### 4.1.1.3 Etape 3

##### 4.1.1.3.1 Analyse des mycotoxines dans les croquettes

L'éleveur a continué de nourrir ces chats avec les croquettes de la marque O. Quelques mois plus tard, il a été confronté de nouveau à des problèmes de reproduction. Nous avons donc analysé de nouveau la nourriture utilisée (O2) ainsi que le sang et le plasma d'une femelle ayant eu des chatons mort-nés. Le foie, le rein et le placenta du chaton mort-né (chaton 3) ont été analysés en même temps. Les résultats sont résumés dans le tableau 53. La seule différence entre la croquette O1 et O2 est le lot. Ce nouveau lot est fortement contaminé en FB et ZEA et contient de l'AFB<sub>1</sub>. Les taux de mycotoxines notés sont plus importants que dans le premier échantillon analysé (O1).

Tableau 53 : Analyse des croquettes (aliments du chat 1 et X).

Echantillon	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>			
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Autres AFB
O2	18,33	252,1	8,9	0,344	0,083	0,027	G2, B2

#### 4.1.1.3.2 Analyse des mycotoxines dans le sang et les organes

Ces mycotoxines ont été retrouvées aussi dans le sang et le plasma (tableau 54) de la femelle porteuse (chat 3) ainsi que les organes du chaton mort-né 3 (tableau 55). La concentration en FB<sub>1</sub> et ZEA dans les organes (foie, rein et placenta) sont très importantes. L'AFB<sub>1</sub> et ses métabolites (G<sub>2</sub> et B<sub>2</sub>) ont aussi été retrouvés dans les organes (tableau 55).

Tableau 54 : Analyse du sang du chat 3

Echantillon	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>			
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Autres AFB
Sang chat 3(mère)	29,518	3,88	NA	0,059	2,36	0,105	B2
Plasma chat3 (mère)	NA	19,75	NA	0,117	1,114	0,464	B2

Tableau 55 : Analyse des organes chaton 3

Echantillon	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>			
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Autres AFB
Foie chaton 3	71,05	79,84	NA	ND	ND	0,749	G2, B2
Rein chaton 3	79,05	87,23	NA	ND	ND	0,492	B2
Placenta chaton 3	67,14	23,12	NA	ND	ND	0,308	B2

### 4.1.2 Résultats du 2<sup>ème</sup> élevage

#### 4.1.2.1 Analyse des mycotoxines dans les croquettes

Des problèmes similaires notamment les problèmes de reproduction, ont été observés dans un autre élevage. Nous avons analysé les croquettes (M3 et PK) ainsi que les organes du chaton 2 de ce 2<sup>ème</sup> élevage. On constate que les deux aliments sont contaminés par plusieurs mycotoxines (tableau 56).

Il y a des taux importants de fumonisine et de ZEA (2 fois la dose journalière admissible de ZEA pour les nourrissons pour la croquette PK et plus de 6 fois pour la croquette M3).

On retrouve aussi des trichothécènes ainsi que de l'OTA. Des aflatoxines sont aussi présentes dans ces 2 aliments.

Tableau 56 : Analyse des croquettes (aliments de la femelle ayant eu le chaton2).

Echantillon	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>			
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Autres AFB
M3	133,63	110,43	104,7	0,074	0,128	ND	G2, G1, B2
PK	41,86	157,95	320,5	0,177	<LOD	<LOD	G2, G1,

#### 4.1.2.2 Analyse des mycotoxines dans les organes

La preuve de la contamination des chatons par les mycotoxines ingérées par la mère réside dans le fait de trouver ces mycotoxines dans le foie, le rein, le cerveau et l'intestin du chaton mort-né 2 (tableau 57).

Tableau 57 : Analyse des organes chaton 2.

Echantillon	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>			
	ZEA (µg/kg)	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Autres AFB
Foie chaton 2	10,91	ND	NA	ND	ND	ND	B2
Rein chaton 2	10	ND	NA	4,39	ND	ND	B2
cerveau chaton 2	72,95	22,27	NA	1,083	ND	0,77	B2
Intestin chaton 2	6,25	ND	NA	0,63	ND	0,047	B2,G1

En plus des mycotoxines retrouvées dans l'aliment, on observe aussi au niveau des organes, des métabolites de la ZEA et de l'OTA.

Il y a une forte accumulation des mycotoxines dans le cerveau. En effet, des quantités importantes de ZEA et de FB sont retrouvées dans cet organe. Quant aux aflatoxines B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>, elles ne se retrouvent que dans le cerveau et l'intestin. L'AFB<sub>2</sub> est retrouvée en plus grande quantité dans le rein que dans les autres organes, ceci est vraisemblablement dû au fait que l'AFB<sub>1</sub> a été métabolisée en AFB<sub>2</sub> (voir figure 120).

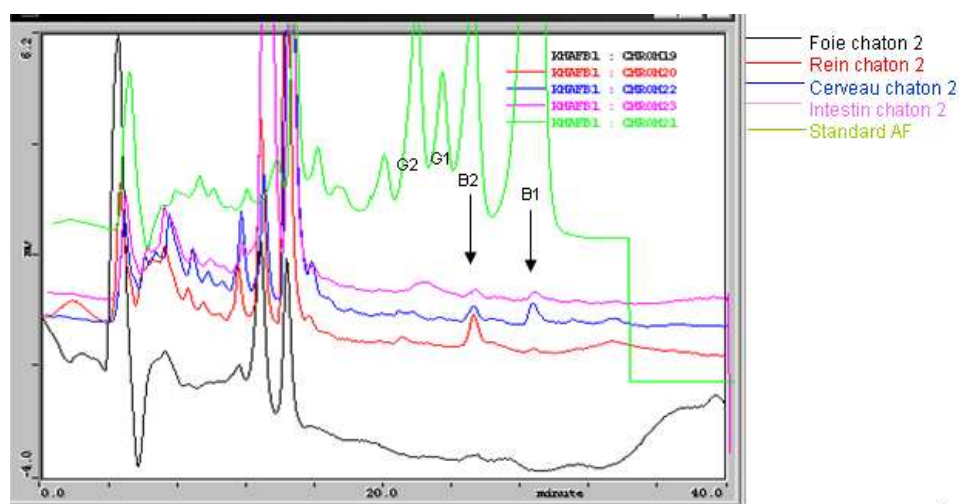


Figure 120 : Profil HPLC de séparation des aflatoxines dans les organes du chaton 2

Bien qu'il y ait peu d'OTA dans la ration, il y a une forte accumulation d'OTA et de ses métabolites dans le rein, qui est un organe cible pour cette toxine (figure 121). Ceci n'est pas étonnant puisque l'OTA s'accumule dans le rein. La demi-vie d'élimination chez la plupart des animaux est de plusieurs dizaines de jours.

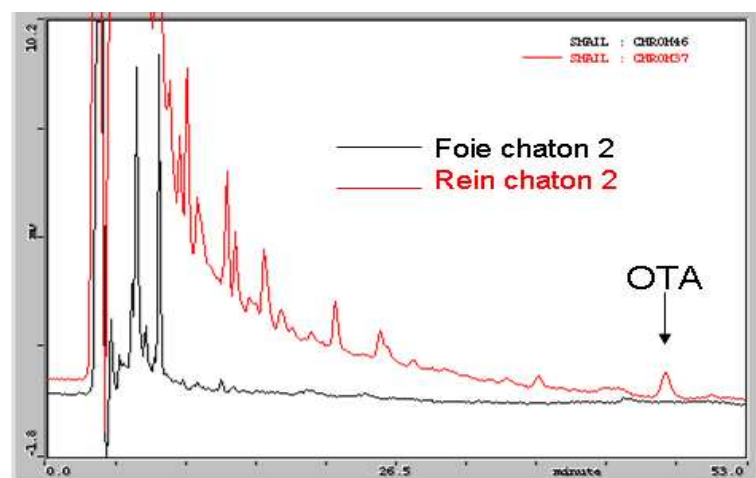


Figure 121 : Profil HPLC de séparation de l'OTA dans les organes du chaton2, foie (en noir) et le rein (en rouge)

Les résultats obtenus nous permettent d'établir un lien direct entre la présence des mycotoxines dans les aliments des animaux de compagnie analysés et les problèmes de reproduction rencontrés chez les éleveurs. Il y a une corrélation entre la présence des mycotoxines dans l'alimentation, dans les organes des chatons mort-nés et les problèmes de reproduction. Lors du changement de nourriture, des améliorations ont été observées. Ces mycotoxines traversent la barrière placentaire et se retrouvent dans les organes des chatons. Ceci est en accord avec d'autres travaux. L'OTA passe dans le placenta, s'accumule et altère un certain nombre de paramètres associés à la croissance et à la différenciation cellulaire embryonnaire chez le rat, en fonction de la dose (Mayura *et al.*, 1986) et chez la souris ; ce qui démontre l'action directe de cette toxine sur le développement embryonnaire. L'administration d'OTA, à des ratte gestantes occasionne une perte de poids des fœtus ainsi qu'une proportion anormale de fœtus présentant des hémorragies (Moré & Galtier, 1974 et 1975). L'OTA a aussi un effet au niveau des testicules; et modifie la spermatogénèse. L'OTA est trouvée dans le plasma séminal de verrats consommant 20 ou 40 µg d'OTA par jour (la viabilité des spermatozoïdes, leur mobilité et leur longévité étant significativement réduites après un délai lié à la durée du cycle de la spermatogénèse, de 39 jours chez le porc. Une baisse de la qualité du sperme a été également constatée par chez des verrats consommant un aliment contaminé par de l'OTA (rapport de l'AFSSA, 2009)

Les AFs sont tératogènes pour le hamster, le rat. L'administration d'une dose unique d'AF provoque des malformations dont la saillie des intestins, voire des avortements. Arora *et al.* (1981) relatent que chez les souris CBA gestante, l'administration d'une dose unique d'AFB<sub>1</sub> provoque des anomalies fœtales (exencéphalie et saillie de l'intestin), uniquement lorsque l'exposition a lieu le 8<sup>ème</sup> jour de gestation mais pas au jour suivant. L'effet tératogène est observé aussi chez les embryons de poulet pour lesquels on note un retard de croissance, une exencéphalie, une microcéphalie, une anophtalmie, un palais fendu (bec de lièvre) et une déformation des maxillaires (Vesley *et al.*, 1983).

La FB<sub>1</sub> affecte les fœtus chez les ratte en gestation engendrant des portées de poids plus faibles et un développement moindre du squelette fœtal. La FB<sub>1</sub> est embryotoxique *in vitro*, elle diminue la croissance et le développement d'embryons de rats en culture, elle diminue la croissance et le développement des embryons de rats (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Il est connu que la ZEA provoque des dommages irréversibles sur le système reproducteur. L'implication de la ZEA ou un des ses métabolites comme agent pouvant contribuer aux problèmes de reproduction chez les animaux familiers, a été formulé. Plusieurs études ont impliqué la ZEA dans les problèmes de fertilité et de reproduction. La zéaralénone et le zéaralanol sont suspectés d'être à l'origine de changements pubertaires chez des jeunes enfants à Porto-Rico. Leur sang contenait de la ZEA et ses dérivés. Il a été observé des naissances prématurées, une puberté précoce et une gynécomastie prépubertaire (Saenz, 1984 et 1985). Mellor (2003) a noté une diminution de la conception, une augmentation de nombre de chiots mort-nés chez les chiens dont la nourriture était contaminée en ZEA. La ZEA (200µg/kg pc/j pendant 7 jours) a provoqué des dommages dans les cellules des ovaires, de l'œdème et une hyperplasie des oviductes et de l'utérus de chiennes (Gajecka *et al.*, 2004a). Dans notre étude (voir chapitre I), les chiens (de 10kg) et les chats (de 3kg) nourris avec les croquettes contaminés en ZEA, pouvait ingérer 196ng/kg pc /j et 800 ng/kg pc /j respectivement, pendant plusieurs jours voir plusieurs mois.

Différentes études chez la souris montrent un impact de la consommation de DON sur la reproduction (Hicks *et al.*, 2000). L'administration de DON entre le 8<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour de gestation entraîne des avortements (9 % dès 2,5 mg/kg de poids corporel/jour ; 100 % au-delà de 10 mg/kg de poids corporel/jour) (Khera *et al.*, 1982). Pour des doses inférieures à 2 mg/kg de poids corporel/ jour, une augmentation des morts-nés, une baisse du poids et de la survie post-natale sont observés (Khera *et al.*, 1984).

Les poils clairsemés des chatons peuvent être dus à la présence de trichothécènes dans leur alimentation. En effet il a été montré que la toxine T2 comme le diacétoxyscirpénol entraînait une malformation au niveau du plumage qui était éparse (Hoerr *et al.*, 1982 ; Carvet & Lecoer, 2006).



### 4.1.3 Analyse des adduits à l'ADN dans les organes des chatons mort-né.

Au cours de cette étude, nous avons aussi recherché les adduits à l'ADN dans certains organes. Les profils d'adduits sont présentés dans la figure 122.

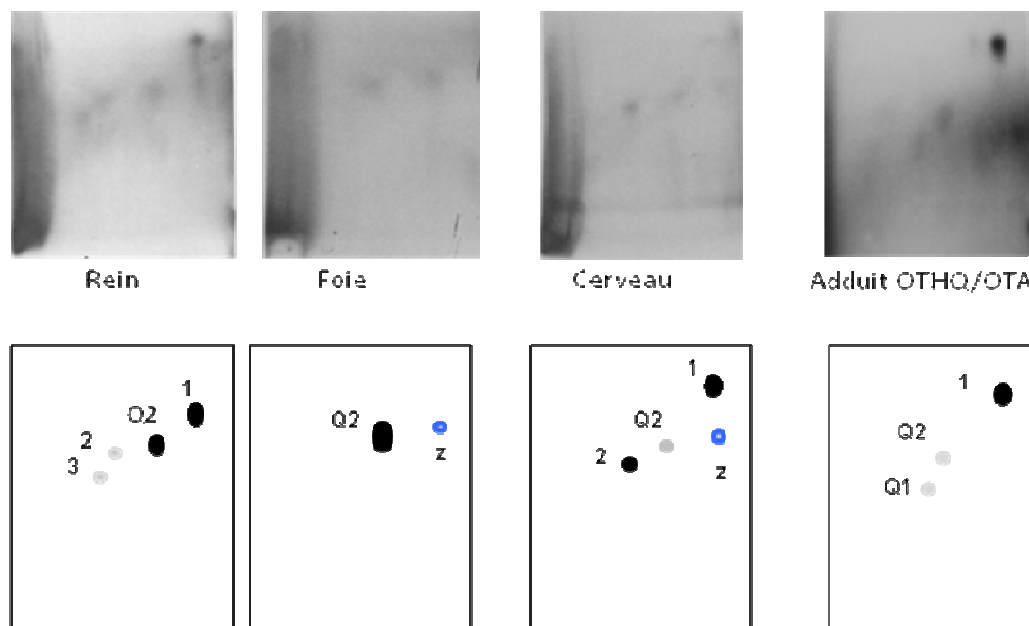


Figure 122 : Profils d'adduits des organes des chatons mort-nés (rein, foie et cerveau)

Dans les foies des chats comme dans le rein, on observe plusieurs adduits. Certains de ces adduits ont des propriétés chromatographiques identiques aux adduits générés par l'OTA. Ceci est surtout flagrant dans le rein du chaton. On observe un des deux adduits spécifiques de l'OTHQ (Q2) et le C-C8-dGOTA (1). Ceci est particulièrement intéressant puisque dans cet organe, nous avons observé une accumulation de l'OTA. D'autre part, nous avons détecté des métabolites d'OTA. Dans le foie du chaton mort-né, il y a moins d'adduit mais néanmoins il y a un des 2 adduits spécifiques de l'OTHQ (Q2). Dans cet organe, nous avons noté une accumulation de l'OTA mais moins importante que dans le rein.

Dans le cerveau du chaton mort-né, nous avons détecté deux adduits spécifiques de l'OTA (le C-C8 dG OTA) et l'adduit Q2 de l'OTHQ. Le profil est similaire à celui obtenu avec le rein. Dans le cerveau, nous avons retrouvés de l'OTA, de l'AFB<sub>1</sub> et des quantités importantes de ZEA et FB<sub>1</sub>.

Les effets de l'OTA ont été démontrés dès les années 1970 (Szczecz, 1978). Les effets tératogènes de l'OTA ont été rapportés par plusieurs auteurs. Elle provoque des anomalies morphologiques chez diverses animaux, chez le rat (Brown *et al.*, 1976), la souris (Hayes *et al.*, 1974), le hamster (Hood *et al.*, 1975), le porc (Shreeve *et al.*, 1977) et les embryons de poulet (Gilani *et al.*, 1978).

L'OTA a été administrée à différentes doses (2 ; 2,5 ; 3,0 ; 3,5 et 4 mg / kg de poids corporel), entre le 6<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> jour de gestation. Les malformations majeures étaient hydrocéphalie externe (accumulation excessive de liquide céphalo-rachidien (LCR) à l'intérieur des cavités du cerveau, due à une mauvaise circulation ou une absorption déficiente du LCR), fermeture incomplète du crâne et l'omphalocèle (absence de fermeture de la paroi abdominale antérieure du fœtus). L'hydrocéphalie interne, la dilatation du bassin rénal et l'hypoplasie rénale sont les anomalies majeures des tissus mous internes. Les défauts squelettiques sont des anomalies du développement des os du crâne, des sternèbres (élément primitif du sternum), vertèbres et des côtes. Ces malformations fœtales ont été le plus marqué sur le 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour de gestation qui est considérée comme la période la plus critique pour l'induction de la tératogénicité chez le rat. La plus forte dose de 4 mg d'OTA/kg de poids corporel est embryo-toxique et foeto-toxique. Une seule administration de 2,75 mg d'OTA/kg de poids corporel entraîne un effet tératogène et est de ce fait considérée comme la dose minimale (Damu, 2007). Des



effets génotoxiques (augmentation du nombre de micronoyaux et des aberrations chromosomiques dans les cellules de la moelle osseuse ; fréquence accrue des échanges de chromatides sœurs dans la moelle osseuse et des splénocytes) ont été observés. Des lésions histologiques principalement de types dégénératifs ainsi que la nécrose du foie, des reins, de l'utérus ont été observés. Au niveau du placenta, du foie, des reins, des yeux, du cerveau et la rate des fœtus, des dommages mitochondriaux et nucléaires ont également été enregistrés. Une réduction de la tératogénicité a été observée par la vitamine C (Damu, 2007).

Les effets dus à l'OTA et d'autres mycotoxines simultanément comme la T-2 (Hood *et al.*, 1978) et l'AFB<sub>1</sub> (Wangikar *et al.*, 2004 ; 2005) ont été rapportés. L'ochratoxine A et toxine T-2, sont connus pour être tératogènes chez les mammifères. Afin de déterminer les effets possibles de l'exposition simultanée, l'ochratoxine A (2 ou 4 mg/kg) et toxine T-2 (0,5 mg/kg) ont été injectés, ensemble ou individuellement, à des souris CD-1 aux 8<sup>ème</sup> ou 10<sup>ème</sup> jours de gestation. L'ochratoxine a induit des malformations cranio-faciales lorsqu'elle est administrée seule au 8<sup>ème</sup> jour, mais pas au 10<sup>ème</sup> jour. La toxine T-2 a induit des anomalies de la queue et des membres particulièrement lorsqu'elle est administrée au 10<sup>ème</sup> jour. Lorsque les deux toxines ont été données ensemble au 10<sup>ème</sup> jour, l'ochratoxine a exacerbé l'incidence des malformations induites par T-2. Une augmentation des effets foetotoxiques a également été notée dans les groupes traités par la combinaison, à la dose élevée sur les deux jours. Les effets sur la croissance fœtale avec la combinaison à dose élevée au 10<sup>ème</sup> jour ont été supérieurs à celles des autres traitements. Peu de malformations squelettiques ou viscérales ont été notées. Ces résultats indiquent que ces agents tératogènes ont des mécanismes différents de tératogénèse. Les effets sont additifs lorsque les substances sont administrées simultanément (Hood *et al.*, 1978).

Des ratte Wistar ont été traités oralement pendant les 6<sup>ème</sup> -15<sup>ème</sup> jours de gestation avec des concentrations croissantes d'OTA (0,125 ; 0,25 ; 0,50 ; 0,75 mg/kg), ou d'AFB<sub>1</sub> (0,125 ; 0,25 ; 0,50 ; 1 mg/kg), et en combinaison (0,125 +0,125 ; 0,25+0,50 ; 0,50+0,25 mg/kg). L'examen histologique des organes du fœtus a révélé que l'OTA, l'AFB<sub>1</sub>, et leurs traitements combinés ont provoqué des changements au niveau des organes internes. Dans le cas de l'OTA, l'incidence des lésions pathologiques du foie, du rein, du cerveau et des lésions oculaires est élevée, alors que lors du traitement à l'AFB<sub>1</sub> ce sont le foie, le cerveau, les reins et le cœur qui sont touchés. L'incidence des lésions cardiaques, en particulier des défauts valvulaires, augmente dans les groupes ayant reçu les deux mycotoxines. L'étude indique que l'apparition de lésions cérébrales, des reins et du foie lors du traitement combiné est moins importante que lors des traitements individuellement par chaque toxine suggérant un effet antagoniste entre l'OTA et l'AFB<sub>1</sub> (Wangikar *et al.*, 2004). L'OTA et l'AFB<sub>1</sub> ont aussi un effet antagoniste chez le lapin suite à une exposition simultanée aux deux toxines respectivement à des doses 0,05 + 0,05 ; et 0,1 + 0,1 mg/kg par poids corporel (Wangikar *et al.*, 2005).

## 4.2 Mycotoxines dans l'alimentation des chevaux

### 4.2.1 Mycotoxines dans la luzerne

Suite à des aphtes récurrents dans la bouche des chevaux, des ulcères et une perte dans un élevage de chevaux, il a été suspecté un effet lié aux mycotoxines. Pour vérifier cette potentialité, six catégories de mycotoxines ont été analysées : ochratoxines (OTA); aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ; citrinine (CIT) ; zéaralénone (ZEA); fumonisines (FB) et désoxynivalénol (DON) dans le sang du cheval et dans la luzerne. Les résultats sont résumés dans le tableau 58, en prenant en compte le rendement de récupération de chaque toxine.

Tableau 58 : Taux des mycotoxines dans la luzerne et le sang du cheval

Mycotoxine/ échantillons	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>		
	ZEA (µg/kg)	FB (µg /kg)	DON (µg/kg)	OTA (ng/kg)	CIT (µg/kg)	AFB (ng/kg)
Sang cheval	31	11	0,033	321	<LOD	364
luzerne	1344	<LOD	110	<LOD	<LOD	75

Nous avons détecté que dans le sang du cheval, de l'OTA, de l'AFB<sub>1</sub>, de la FB<sub>1</sub>, de la ZEA et du DON.

Comme la luzerne était suspectée être responsable, seul cet aliment a été analysé. Dans la luzerne, de l'AF, la ZEA (très forte concentration de 1,3 mg/kg) et de la DON (chef de file des trichothécènes) ont été retrouvées. Ni la FB, ni l'OTA, ni la CIT n'ont été détectées. Ceci signifie que la luzerne n'est pas la seule origine de la contamination. Le taux de ZEA (1344µg/kg) est particulièrement inquiétant, et pourrait avoir un effet délétère sur la fertilité des animaux. Ce taux est de 26 fois plus élevé que celui autorisé en alimentation pour les porcs (50µg/kg).

La présence de DON peut expliquer la formation d'aphtes buccaux. L'ingestion de doses de trichothécènes (5 mg/kg d'aliment) entraîne des nécroses buccales et gastro- intestinales ainsi qu'une diminution du gain de poids (Chi & Mirocha, 1978 ; D'Mello *et al.*, 1999). Phénomène amplifié par la présence des autres toxines. Ces toxines ont d'autres effets sur la santé des animaux (problèmes hépatiques voire rénaux), diminution de la vitalité des animaux.

De nouveaux effets sont décrits chez les volailles après absorption simultanée de plusieurs toxines: accroissement de la quantité de protéines dans le sang (FB<sub>1</sub>-DON) (Harvey *et al.*, 1996), du taux de calcium sérique (FB<sub>1</sub>-toxine T-2 ) (Kubena *et al.*, 1997a) et du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite (Kubena *et al.*, 1995). Le DON agit en synergie avec le nivalénol (Madhyastha *et al.*, 1994 ; Tajima *et al.*, 2002).

#### 4.2.2 Mycotoxines dans le foin

Nous avons effectué 3 prélèvements (foin 1, foin 2 et foin 3) d'un même ballot de foin d'aspect hétérogène. Le cheval ayant consommé cet aliment avait des coliques violentes avec dégradation des paramètres vitaux et des périodes d'abattements suivis de manifestations violentes. L'état de santé du cheval a empiré en quelques jours. Vu sa grande agitation et les douleurs, le cheval a été euthanasié. Comme il semblait y avoir une corrélation entre l'alimentation et les problèmes de santé, et comme les symptômes et la description de l'autopsie laissait penser à une contamination par des mycotoxines, il a été procédé à des analyses de mycotoxines dans le foin. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 59.

Tableau 59 : Taux des mycotoxines dans les échantillons de foin

Mycotoxine/échantillons	Toxines de champs produites par <i>Fusarium</i>			Toxines de stockage produites par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>		
	ZEA (µg/kg)	FB (µg/kg)	DON (µg/kg)	OTA (µg/kg)	CIT (µg/kg)	AFB (µg/kg)
Foin 1	346	<LOD	71	<LOD	<LOD	3,1
Foin 2	352	<LOD	49	<LOD	<LOD	1,8
Foin3	900	<LOD	63	<LOD	<LOD	3,2

La répartition en mycotoxine est très hétérogène. Ce ballot de foin contient des quantités très importantes de ZEA et des quantités importantes d'AFB<sub>1</sub>. On note aussi la présence de DON (désoxynivalénol, chef de file des trichothécènes). Il n'y a pas par contre ni OTA, ni CIT, ni FB.

La ZEA est retrouvée à des quantités de 7 à 18 fois plus élevées que celle autorisée en alimentation pour les porcs (50µg/kg).

Nos résultats bien que plus faibles concordent avec ceux obtenus par le laboratoire « Eurofins » qui ont détecté une présence encore plus élevée de zéaralénone (18000µg/kg). Ceci n'est pas contradictoire mais confirme bien l'hétérogénéité du foin. Un taux aussi élevé de zéaralénone peut à lui tout seul expliquer la mort du cheval. Il est important de noter que les mycotoxines agissent en synergie. L'effet combiné de plusieurs mycotoxines a été étudié (Speijers *et al.*, 2004), notamment l'effet simultané de l'AFB plus l'OTA (Verma *et al.*, 2002 et 2007; Sandhu *et al.*, 1995; El Goll-Bennour *et al.*, 2010 ; Imperato *et al.*, 2011), l'effet combiné de l'AFB plus la FB (Ogido *et al.*, 2004 ; Bernabucci *et al.*, 2011),et la FB plus la ZEA plus l'OTA (Domijan *et al.*, 2005).

Les résultats d'autopsie (coliques, aspect inflammatoire et noirâtre du colon ; problème de comportements) mettent en avant une intoxication par des trichothécènes, dont font partie le DON,

mais également la satratoxine élaborée par *Stachybotrys atra*. Ce champignon a été mis en évidence sur le foin par l'école nationale vétérinaire de Toulouse (ENVT).

L'hypertrophie du foie pourrait être due à la présence d'aflatoxine. Le décès du cheval peut s'expliquer par l'ingestion du foin contaminé par des taux élevés de ZEA, associée à de la DON et aux mycotoxines produites par *Stachybotrys atra* ainsi qu'à l'aflatoxine B. Ces mycotoxines agissent en synergie ce qui réduit la marge de sécurité.

#### 4.2.3 Mycotoxines dans le maïs

Plusieurs chevaux sont morts subitement après ingestion de maïs doux (figure 123), en présentant des symptômes ressemblant à une intoxication aiguë par les fumonisines B. Des signes de leucoencéphalomalacie ont été observés. L'autopsie montre clairement l'infiltration d'un liquide jaunâtre et d'un œdème (figure 124) (voir photos faite par le Dr Hugnet : Expert Judiciaire. Département des Sciences Biologiques Fondamentales et Appliquées Unité des Sciences Pharmaceutiques et Toxicologiques). Le foie était nécrosé.



Figure 123 : Le maïs à l'origine de l'intoxication

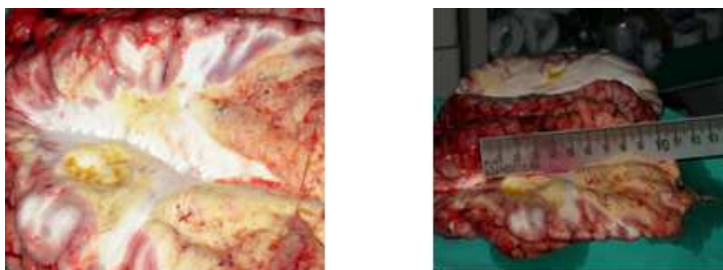


Figure 124 : Infiltration d'un liquide jaunâtre dans les méninges (Cerveau de cheval) (photo de gauche). Taille de la lésion au niveau du cerveau de cheval (photo de droite).

Le cerveau, le rein, le foie et du sang d'un des animaux a été immédiatement prélevés et envoyés au laboratoire pour analyse. Un échantillon de maïs a également été prélevé.

La présence de fumonisines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub> dans les organes et dans le maïs a été recherchée. Comme d'autres mycotoxines, peuvent se former lors d'ensilage ou mauvaise conservation des céréales et peuvent être à l'origine d'un effet synergique, la présence d'OTA et CIT a aussi été recherchée.

##### 4.2.3.1 Préparation des échantillons pour l'analyse des fumonisines

Les échantillons de maïs prélevés le jour du décès ont été séparés en deux lots, ceux « visiblement fusariés » (VF) et ceux « non visiblement fusariés » (NVF). Dans chaque lot il a été prélevé un épi complet (feuilles, grains, et centre) qui a été découpé et broyé au Waring blender. Sur chaque 'broyat' d'épi, il a été prélevé deux portions de 20 grammes

Deux ml de sang qui ont été mélangés à 18 ml de méthanol (MeOH) : acétonitrile : eau (25 : 25 : 50) et agité pendant 1 heure avant centrifugation. Le surnageant a été collecté pour purification par colonne d'immuno-affinité et analyse par HPLC.

Les organes suivant ont été analysés : Foie nécrosé (3,85 g) ; Foie non nécrosé (3,20 g) ; Rein (3,29 g) ; Cerveau nécrosé (3,6 g).

Chaque morceau de tissu a été découpé en dés de 1 mm<sup>3</sup> environ, puis broyé au Poter en présence d'acétonitrile : eau (50 : 50) (10ml pour 1g de tissu) selon Smith & Thakur, 1996. Après homogénéisation complète, la 'bouillie' a été agitée pendant 1 heure puis filtrée sur papier Whatman. Le filtrat est purifié sur colonne d'immuno-affinité (IAC).

La graisse a été analysée. 5,6 g de graisse prélevée au niveau du rein ont été découpés en petit dés de 1-2 mm<sup>3</sup> et broyés au Poter dans de l'hexane (100 ml d'hexane pour l'échantillon). Le mélange a été filtré sur filtre Whatman puis le résidu a été repris dans 20 ml d'acétonitrile : eau (50 : 50) et agité pendant 1 heure. Le mélange a ensuite été filtré. Le filtrat est purifié sur colonne d'immuno-affinité (IAC). Les résultats des FBs sont indiqués dans le tableau 60. Les résultats sont des résultats bruts sans rectification en fonction du rendement d'extraction. Ceci sous entend que les valeurs sont sous estimées.

Tableau 60 : Analyse des Fumonisines

Type/N° Echantillon	Concentration en FB <sub>1</sub>
Sang	2,8 µg/l
Graisse	1,0 ng/g
Cerveau	3,7 ng/g
Rein	1,2 ng/g
Foie nécrosé	3,8ng/g
Foie non nécrosé	7,1 ng/g
Maïs non visiblement fusarié (NVF)	1,1 mg/kg
Maïs visiblement fusarié (VF)	0,71 mg/kg

Le maïs « apparemment sain » (non visiblement fusarié) comme celui fusarié contient une quantité importante de FB<sub>1</sub> (supérieure à 1mg/kg). Le maïs non fusarié en contient 30% de plus que le fusarié. Le maïs non visiblement fusarié contient aussi d'autres fumonisines, dont la FB<sub>2</sub> mais en quantité bien inférieure à la FB<sub>1</sub>.

Pour le maïs visiblement fusarié, il y a aussi de la FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub> et d'autres pics dans cette même zone qui correspondent sans doute à d'autres fumonisines, mais qu'on ne peut pas quantifier par manque des standards correspondants.

Dans le sang de l'animal, on retrouve une quantité non négligeable de fumonisine.

La fumonisine se retrouve dans tous les organes (foie, rein, cerveau) de l'animal. Les plus grandes quantités se retrouvent dans le foie. La partie non nécrosée du foie en contient deux fois plus que la partie nécrosée. On en retrouve aussi beaucoup dans le cerveau, mais également dans le rein et la graisse. S'il est clair que l'animal est mort suite à une intoxication aigue à la FB, le fait que le foie de l'animal soit nécrosé laisse supposer que l'animal avait sans doute été contaminé auparavant par d'autres mycotoxines à des quantités plus faibles. Pour cette raison, nous avons analysé la présence d'OTA et de CIT.

#### 4.2.3.2 Préparation des échantillons pour l'analyse de l'OTA et la CIT

L'extraction et l'analyse sont réalisées par les méthodes classiques pour ces deux toxines. Les résultats de dosage d'OTA et de CIT sont résumés dans le tableau 61.

*Tableau 61 : Analyse de l'ochratoxine A et la citrinine*

Type d'échantillon	OTA	CIT
Maïs moisiss	ND	ND
Maïs sain (non moisiss)	ND	ND
Foie	0,66 ng/g	ND
Rein	1,3 ng/g	ND
cerveau	ND	ND

Ni l'OTA, ni la CIT ne sont retrouvées dans le maïs. Par contre, l'OTA est retrouvée dans le rein et le foie de l'animal.

Comme l'OTA est ubiquitaire et qu'elle s'accumule et persiste longtemps dans l'organisme, le fait d'en retrouver dans les organes du cheval s'explique car il a du être en contact avec des aliments contaminés avant l'ingestion de ce maïs. Nous avons vu précédemment qu'il y avait un effet synergique entre les deux toxines, ce qui explique sans doute pourquoi à des taux de 1mg/kg de FB, on observe la mort de l'animal.

## 5. Conclusion du chapitre

Les deux lignées cellulaires : cellules rénales humaines (HK2) et les cellules mammaires humaines (MCF7) testées au cours de cette étude réagissent différemment selon la toxine testée et la combinaison de toxines. Ceci peut s'expliquer par une différence de métabolisation ou de réparation pour chaque lignée suivant ses caractéristiques.

De plus, l'effet de chaque mycotoxine prise individuellement ou combiné à d'autres toxines diffère. Cela nous fait supposer qu'elles n'agissent pas sur les mêmes sites, et qu'elles font appel à différents types de transport et de métabolisation. L'hypothèse la plus vraisemblable est la modulation de la métabolisation de l'une sur l'autre, comme cela est le cas pour la CIT et l'OTA (Molinié, 2004 ; Pfohl-Leskiewicz *et al.*, 2007).

Les résultats obtenus de l'étude de relation-structure-activité proposent des mécanismes d'action différents pour la génotoxicité et la cytotoxicité OTA, et sont conformes aux résultats récents montrant que la mutagénicité de l'OTA provient de sa génotoxicité directe, tandis que la cytotoxicité est dérivée de dommages oxydatifs à l'ADN.

Aussi bien sur les cellules, comme chez les animaux, l'effet génotoxique de l'OTA est amplifié par la présence d'autres mycotoxines (CIT ou FB<sub>1</sub> ou ZEA). L'effet des ces mycotoxines sur l'OTA sont à l'origine d'une synergie.

Les mesures réglementaires en vigueur dans l'Union Européenne sont parmi les plus sévères. Même si ces études et ces réglementations ont permis de diminuer le risque à un niveau très faible, le risque de la multicontamination persiste. Nous avons observé des effets génotoxiques même à des concentrations considérées comme sûre (concentration de l'ordre de la dose journalière admissible). Certaines concentrations de mycotoxines n'ayant pas ou peu d'effet sur la viabilité cellulaire, peuvent avoir des effets drastiques du point de vue génotoxique. Il a été observé des adduits à l'ADN à des concentrations, sensée protéger des effets cancérogènes (5 ng d'OTA/kg poids corporel/jour et de 200ng FB<sub>1</sub>/kg pc/j).

D'autre part, nous avons constaté que lorsque les doses de mycotoxines sont élevées, la cytotoxicité l'emporte sur la formation des adduits.

La détection des adduits pourra servir dans le domaine du diagnostic et du pronostic de développement de cancers. Leur détection à un moment précoce pourrait être un biomarqueur pour le suivi d'une contamination et pour la mise en place d'un traitement avant développement d'un cancer.

Sur tous les animaux, il a été constaté des effets toxiques, qui apparaissent à des concentrations faibles, inférieures aux recommandations pour animaux voire pour nourrissons. L'effet d'accumulation de ces toxines dans les organes cibles (foie et rein) doit être pris en compte lorsque les animaux sont nourris pendant une longue période avec des aliments contaminés en mycotoxines. Ces mêmes mycotoxines ont été transmis au fœtus. Elles ont été retrouvées dans les organes des chatons mort-nés. L'analyse des organes montrant bien qu'il y a eu absorption et distribution jusque dans le cerveau des animaux. La quantité des mycotoxines dans les tissus dépend de la quantité dans les aliments pour animaux.

Les co-contaminations ne sont pas prises en compte dans les législations. C'est un tort car plusieurs d'entre elles ont des effets synergiques. Ainsi la CIT amplifie l'effet néphrotoxique et le cancer induit par l'OTA. La FB<sub>1</sub> amplifie la toxicité de l'OTA. Des effets synergiques de la CIT et de l'OTA ont été démontrés (Pohland *et al.*, 1992). Des études *in vivo* ont montré que la présence simultanée de ces deux mycotoxines favorise la mort chez les souris (Boorman, 1989), et les chiens (Kitchen *et al.*, 1977).

D'autre part, la législation ne concerne que les animaux de la ferme. Il conviendrait d'établir des seuils pour animaux familiers (chat et chien) comme celles établis pour les nourrissons, en prenant en compte la durée de vie de l'animal, sa taille, le fait qu'il est nourri par le même aliment durant toute sa vie, ainsi que son métabolisme.

De plus, ces mycotoxines sont très stables puisqu'on en retrouve dans les produits transformés. En vue d'éviter des effets sur la santé humaine et des pertes économiques dans les élevages, il est indispensable de trouver des moyens de détoxification après transformation. Cet aspect a été étudié dans le chapitre III.

## **Résultats et discussions**

---

### **Chapitre III**

#### **Désactivation de l'ochratoxine A (OTA) et la zéaralénone (ZEA) par les parois de levures et les levures enrichies en glutathion ou en sélénométhionine**

La contamination fongique étant difficile à éviter, la décontamination des ressources alimentaires se révèle donc être un enjeu important en santé humaine et animale mais également un enjeu économique. Plusieurs techniques de réduction en mycotoxine de la matrice alimentaire ont été élaborées avec plus ou moins de succès comme l'ionisation ou l'inactivation des mycotoxines par la température. Les inconvénients majeurs de ces techniques sont la détérioration en partie l'aliment ; le coût et la méconnaissance des effets que peuvent avoir les produits de dégradation (Schatzmayer *et al.*, 2006 ; Kolosova & Stroka, 2011).

D'autres méthodes plus récentes consistent à empêcher que la mycotoxine ne soit absorbée au niveau du tube digestif. L'une des méthodes les plus efficaces semble être l'utilisation de composés adsorbants. C'est-à-dire lient à leur surface, de manière plus ou moins spécifique, les composés divers avec lesquels ils sont en contact, dits adsorbats, les rendant moins bio disponibles. Les adsorbants sont ajoutés à l'aliment et fixent les mycotoxines, mais aussi d'autres composés de l'aliment, dans le tractus digestif de l'animal. L'adsorbant n'étant pas assimilé par l'organisme, il est évacué avec l'adsorbat lié.

Comme nous avons mentionné dans l'introduction un des inconvénients des adsorbants inorganiques est leur manque de spécificité ainsi que leur faible efficacité vis-à-vis des mycotoxines autre que l'aflatoxine. Les parois de levure ou levures inactivées présentent des bonnes capacités d'adsorption vis-à-vis de plusieurs mycotoxines, ce qui est particulièrement important puisque la nourriture est très fréquemment contaminée par plusieurs mycotoxines simultanément. Un autre avantage est que les levures sont biodégradables et ne vont pas s'accumuler dans l'environnement puisqu'elles ne persisteront pas dans les déjections des animaux à l'instar des adsorbants inorganiques. D'autre part, les levures entières possèdent des enzymes pouvant éventuellement favoriser la dégradation des mycotoxines.

Etant donné que certaines mycotoxines sont connues pour provoquer un stress oxydatif au niveau cellulaire, nous avons testé l'effet de levures enrichies en antioxydants. Ainsi, nous avons concilié deux techniques de désactivation à savoir l'adsorption et l'utilisation des antioxydants.

L'efficacité du pouvoir désactivateur (adsorption, biodégradation) des produits dérivés de levures a été testée. Nous avons réalisé deux types d'études. L'une en culture cellulaire en étudiant la désactivation de deux mycotoxines : l'OTA et la ZEA toutes deux connues pour impacter les élevages porcins et de volaille ; l'autre *in vivo* sur poulet ingérant de l'OTA. Les produits de levure testés au cours de notre étude ont été fournis par la société Lesaffre.

## **1. Désactivation de l'OTA et de la ZEA par les levures enrichies en antioxydant (glutathion et sélénométhionine) dans les cellules rénales (HK2) et les cellules des glandes mammaires (MCF7)**

### **1.1 Evaluation de la viabilité cellulaire suite à l'exposition des cellules (HK2 et MCF7) au glutathion pur ou à la sélénométhionine pur**

#### ***1.1.1 Effet du glutathion et sélénométhionine sur la viabilité des cellules rénales humaines (HK2)***

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'impact du glutathion seul ou de la sélénométhionine sur la viabilité des cellules rénales, exposées à trois concentrations (1 ; 10 et 100µM). L'effet de ces composés est représenté dans la figure 125.



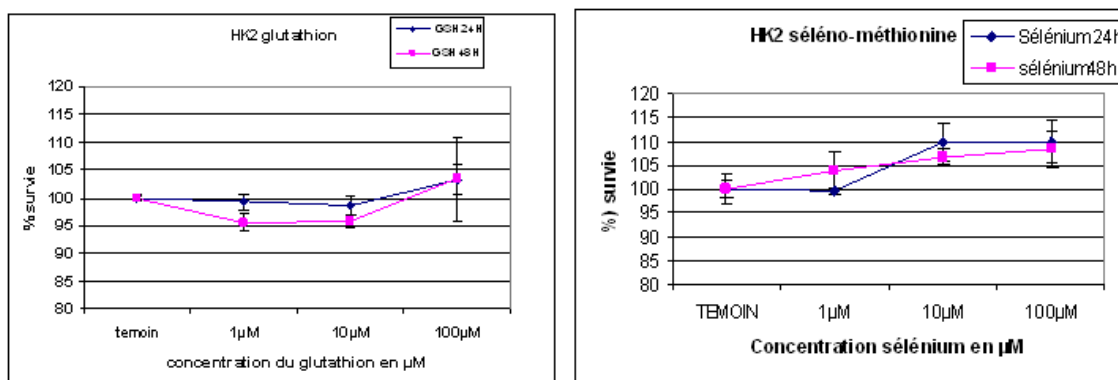


Figure 125 : Taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des concentrations du glutathion pur (à gauche) et du sélénométhionine (à droite) après 24h et 48h d'exposition.

Le glutathion par lui-même ne module pas ou très peu la viabilité des cellules rénales humaines après 24 et 48h d'exposition.

La sélénométhionine pur induit une très légère prolifération cellulaire aux concentrations de 10 et 100 μM, quelque soit le temps d'exposition.

### 1.1.2 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence de glutathion sur la viabilité cellulaires des HK2

Pour tester l'effet combiné du glutathion avec la ZEA ou l'OTA, nous avons pris comme concentration en mycotoxine 10 μM. Nous avons testé deux concentrations en glutathion (10 et 100 μM) (figure 126).

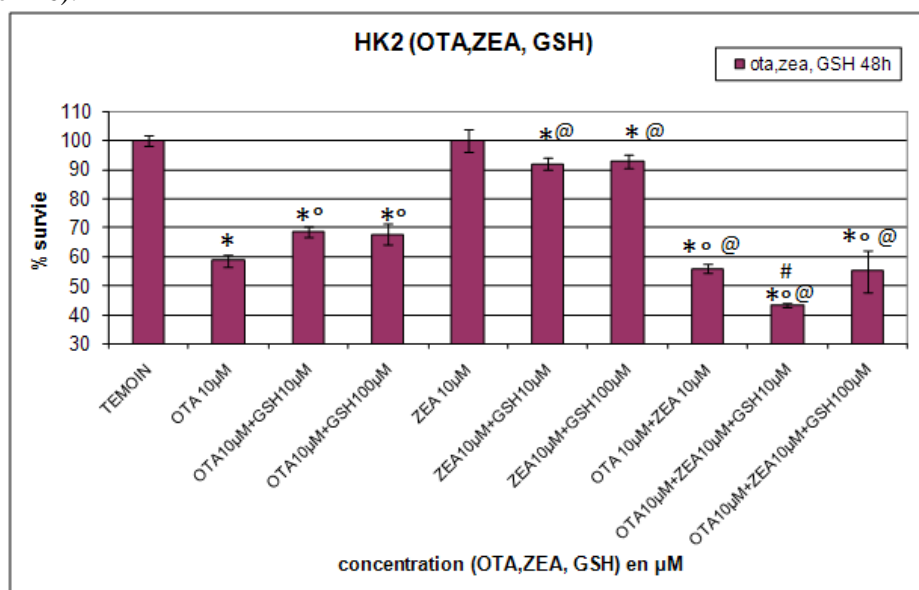


Figure 126 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des concentrations du glutathion pur et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA) après 48h d'exposition. \* différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ; @ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ; # différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA

On constate que le glutathion pur (GSH) a un effet protecteur vis-à-vis de l'effet cytotoxique provoqué par l'OTA seule sur les cellules HK2 après 48h (70% viabilité *versus* 60%). Néanmoins la protection n'est pas totale, et ne dépend pas du taux de GSH.

Le glutathion associé à la ZEA diminue la viabilité cellulaire alors que la ZEA seule à cette concentration n'avait aucun effet après 48h (90% viabilité *versus* 100%). Le taux de GSH n'a pas d'influence sur cette baisse de viabilité.

L'effet combiné OTA + ZEA (10  $\mu$ M) entraîne un effet cytotoxique plus important que celui provoqué par l'OTA seul.

En présence de 10 $\mu$ M de GSH, l'effet cytotoxique engendré par l'exposition aux deux toxines simultanément est amplifié par rapport à l'exposition aux toxines prises indépendamment en présence de GSH. On note un effet synergique puisque la cytotoxicité est de 55% lorsque les deux toxines sont présentes en même temps que le GSH, et était respectivement de 30% lors de l'exposition à l'OTA et le GSH ; et 10% lors de l'exposition à la ZEA et la GSH.

Lors d'une exposition simultanée aux mycotoxines en présence de 10 fois plus de GSH, il n'y a plus de différence significative comparé à l'exposition aux deux toxines en absence de GSH.

### 1.1.3 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence de sélénométhionine sur la viabilité cellulaire des HK2

L'effet de la sélénométhionine (1 et 10  $\mu$ M) et des mycotoxines (OTA et ZEA) a été testé sur les cellules rénales humaines (HK2). Le pourcentage de survie cellulaire est représenté dans la figure 127.

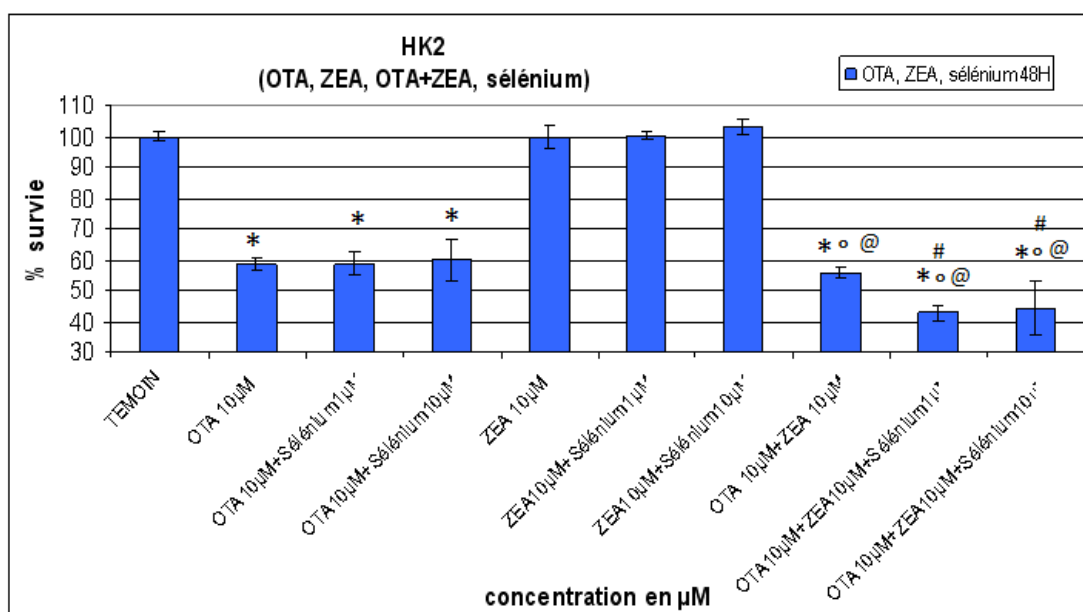


Figure 127 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction des concentrations du sélénio--méthionine pur et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA) après 48h d'exposition. \* différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ;@ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ;# différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA

La sélénométhionine aux deux concentrations choisies n'a aucun effet sur la cytotoxicité induite par le traitement à l'OTA seule 10 $\mu$ M. La ZEA ne modifie pas la viabilité cellulaire que les cellules soient exposées à la ZEA seule ou en présence de sélénométhionine.

Par contre, lorsque les 2 mycotoxines sont présentes simultanément, la cytotoxicité est plus importante comparée à celle observée lorsque les cellules sont traitées qu'avec de l'OTA (60 % viabilité versus 55%). Par contre la cytotoxicité est nettement amplifiée par la sélénométhionine (42 % viabilité versus 55 %) Le taux de sélénométhionine n'influe pas.

### 1.1.4 Effet du glutathion et sélénométhionine sur la viabilité des cellules des glandes mammaires (MCF7)

L'effet du glutathion pur et de la sélénométhionine pure a été testé sur la viabilité des cellules humaines de glandes mammaires (MCF7) (figure 128).

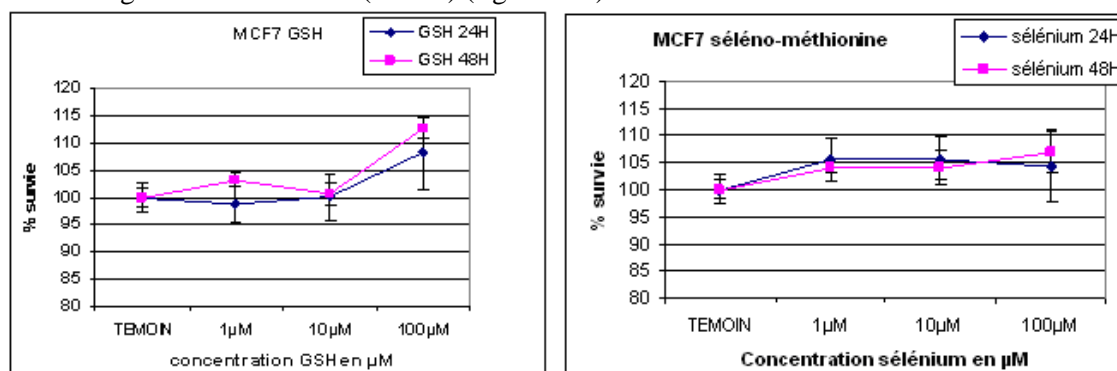


Figure 128 : Taux de survie des cellules humaines mammaires(MCF7) en fonction des concentrations du glutathion pur (à gauche) et du sélénométhionine (à droite) après 24h et 48h d'exposition.

Aux concentrations de 1 et 10 μM, le glutathion n'a pas d'effet significatif sur la viabilité des cellules MCF7. A forte dose 100 μM, le GSH induit une prolifération cellulaire aussi bien après 24h d'exposition que 48h.

La sélénométhionine ne modifie pas de manière significative la viabilité cellulaire des cellules MCF7.

### 1.1.5 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence du glutathion sur la viabilité cellulaire des MCF7

Sur la figure 129 est présenté le pourcentage de survie des cellules mammaires humaines(MCF7) exposées au glutathion pur et aux mycotoxines (OTA, ZEA, OTA+ZEA).

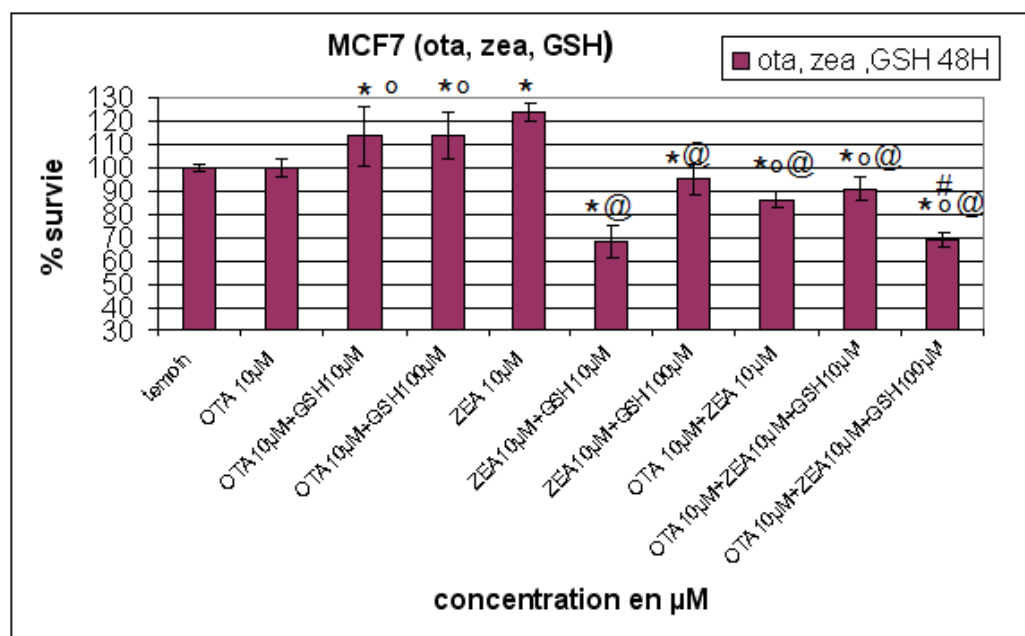


Figure 129 : Comparaison du taux de survie des cellules mammaires humaines (MCF7) en fonction des concentrations du glutathion pur et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA) après 24h et 48h d'exposition. \* différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ; @ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ; # différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA

L'OTA seule n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire des MCF7 alors qu'en présence de glutathion, on observe une prolifération cellulaire significative (115% *versus* 100%). La concentration en glutathion n'influe pas.

La ZEA seule a un effet proliférateur (123% *versus* 100%). Le GSH inverse l'effet de la ZEA de manière drastique. En présence de GSH (10 $\mu$ M) la viabilité cellulaire n'est plus que de 68%. Comparé à l'effet de la ZEA seule, on constate un différentiel de viabilité de 55% (68% *versus* 123%). Avec une quantité dix fois plus importante en GSH (100 $\mu$ M), la cytotoxicité est moins importante. La viabilité cellulaire est presque équivalente à celle des cellules témoin. Le GSH a donc un effet antagoniste à celui de la ZEA.

L'exposition simultanée des cellules à la ZEA+OTA diminue significativement la viabilité cellulaire (88% *versus* 100% par rapport OTA seule ; *versus* 123% par rapport ZEA seule). La cytotoxicité est significativement augmentée en présence de 100  $\mu$ M de GSH (70% de viabilité). Avec 10 fois moins de GSH (10 $\mu$ M) et les deux toxines, la viabilité cellulaire est presque équivalente à celle des cellules exposées à la ZEA et 100 $\mu$ M de GSH.

### 1.1.6 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence de sélénométhionine sur la viabilité cellulaire des MCF7

Les cellules mammaires humaines (MCF7) ont été traitées avec du sélénométhionine et les toxines. Les résultats du % de survie des cellules sont présentés sur la figure 130.

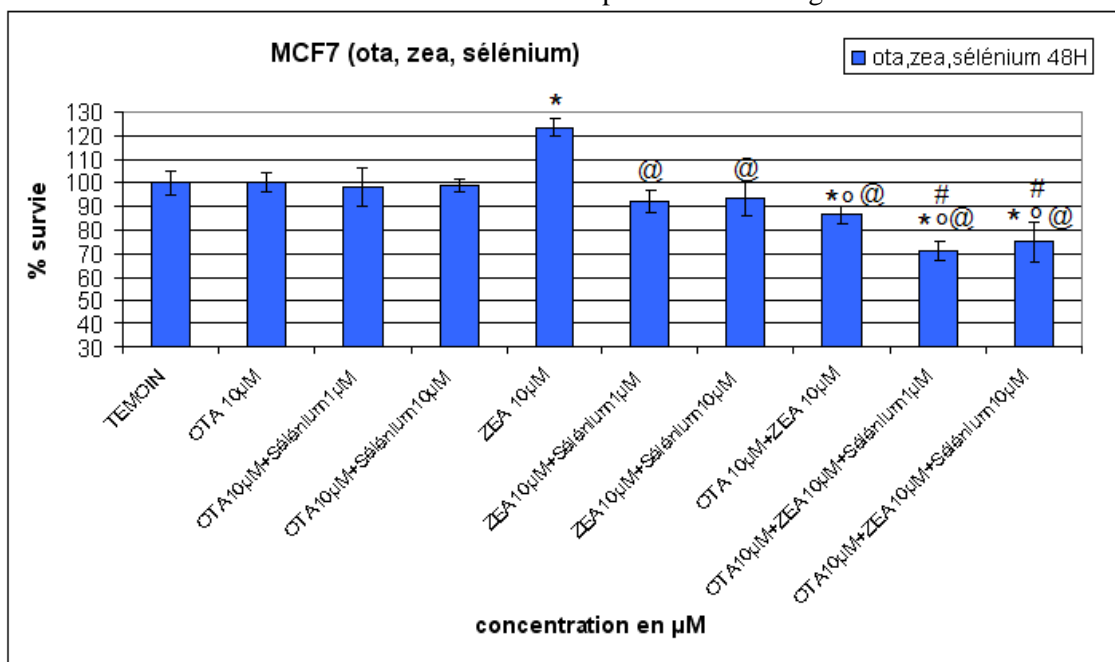


Figure 130 : Comparaison du taux de survie des cellules mammaires humaines (MCF7) en fonction des concentrations du sélénio-méthionine pur et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA) après 24h et 48h d'exposition. \* différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; @ différence significative par rapport à exposition à OTA seule ; @ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ; # différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA

La sélénométhionine n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules MCF7 exposées à l'OTA. Par contre l'ajout de sélénométhionine empêche la prolifération provoquée par la ZEA sur les cellules MCF7. Il y a un effet antagoniste. Quelle que soit la concentration en sélénométhionine, on note une baisse significative de la viabilité cellulaire des cellules exposées à la ZEA. Le différentiel de viabilité est de 33%.

L'ajout de sélénométhionine aux cellules exposées à l'OTA et à la ZEA simultanément amplifie l'effet cytotoxique induit par les 2 toxines (70% *versus* 88% par rapport à exposition aux deux toxines). Si on compare la viabilité cellulaire par rapport à celle obtenue lorsque les cellules sont exposées à la ZEA et à la sélénométhionine on constate un effet synergique en présence d'OTA (70% *versus* 90%).

## 1.2 Evaluation de la viabilité cellulaires des HK2 et MCF7 exposées à l'OTA, la ZEA en présence de levures enrichies en glutathion ou en sélénométhionine

L'effet des levures enrichies en glutathion ou des levures sélénées a été testé sur les deux lignées cellulaires (HK2 et MCF7). L'effet a été comparé à l'impact du glutathion seul, ou de la sélénométhionine seule. La levure sélénée est une levure inactivée de *Saccharomyces cerevisiae* (CNCM I-3399) riche en sélénium organique (principalement Sélénométhionine), car elle est cultivée sur un milieu enrichie en sélénium (voir fiche technique en annexe 6). La levure glutathion est une levure inactivée de souche *Saccharomyces cerevisiae* naturellement riche en glutathion (voir fiche technique en annexe 7).

L'adjonction des levures a été séquentielle. Les toxines ont été ajoutées soit au même moment que les levures [OTA+levure, ZEA+levure, (OTA+ZEA) +levure], soit une heure avant les levures [OTA 1h, ZEA 1h, (OTA+ZEA) 1h] ou une heure après les levures [levure 1h + OTA, levure 1h + ZEA, levure 1h + (OTA+ZEA)].

### 1.2.1 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence de levures enrichies en glutathion(LGSH) sur la viabilité des cellules rénales humaines (HK2)

Nous avons testés l'impact des levures enrichies en glutathion sur la viabilité des cellules rénales humaines (HK2). La viabilité cellulaire est représentée dans la figure 131.

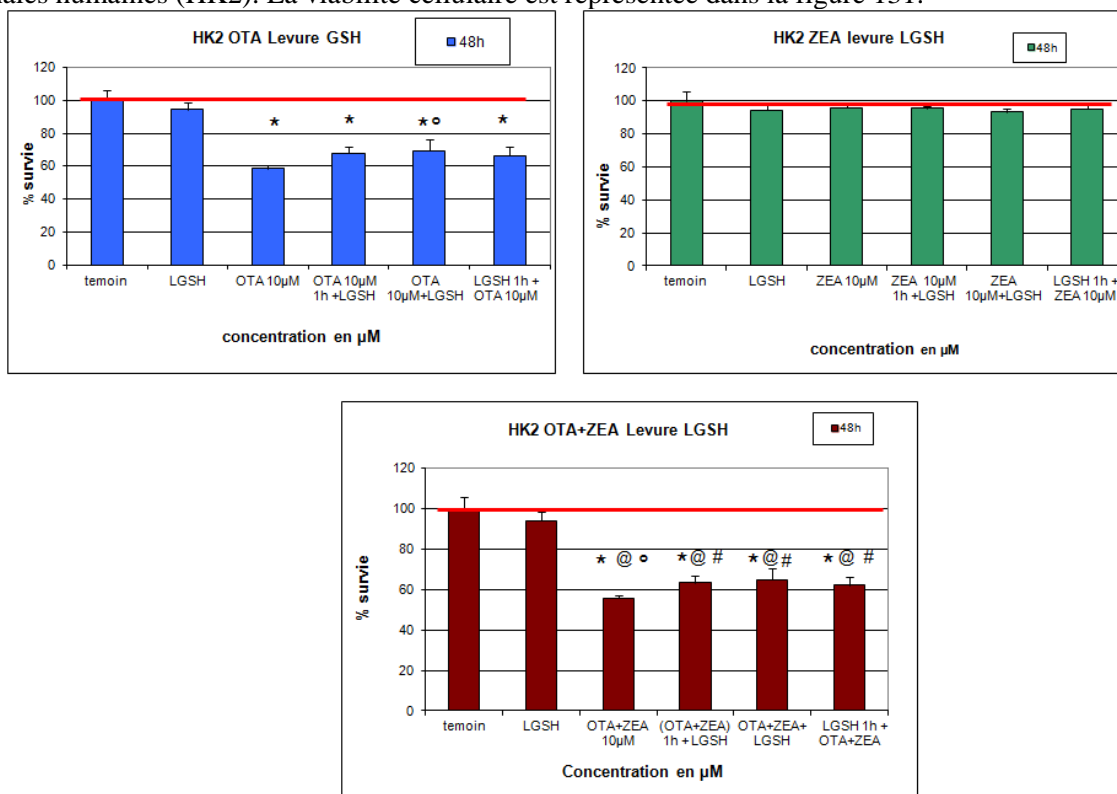


Figure 131 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction du temps d'introduction des levures enrichies en glutathion et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA). \* différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ;@ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ;# différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA

Les levures enrichies en glutathion, par elles-mêmes ne modifie pas la viabilité cellulaire. Contrairement au glutathion pur, les levures enrichies en glutathion n'ont pas la capacité à réverser de manière significative l'effet cytotoxique de l'OTA lorsqu'elles sont ajoutées une heure avant ou une heure après l'exposition à l'OTA. Une légère amélioration est observée lorsque les levures sont ajoutées simultanément à la toxine (70% viabilité *versus* 60%). Il n'y a pas d'effet non plus lorsque les

cellules sont exposées à la ZEA et aux levures. Lorsque les cellules sont exposées aux deux toxines, il y a une faible amélioration de la cytotoxicité en présence des levures enrichies au glutathion et des deux toxines. La cytotoxicité observée est identique à celle observée lorsque les cellules sont exposées à l'OTA dans les mêmes conditions. Si on compare l'effet des levures enrichies au glutathion et le glutathion pur : faible effet avec les levures, le glutathion pur reverse l'effet de l'OTA et en présence de ZEA ou OTA+ZEA induit une cytotoxicité. Ceci pointe le fait que l'effet n'est pas du seulement à la présence du glutathion.

### 1.2.2 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence des levures enrichies en sélénométhionine (LS) sur la viabilité des cellules rénales humaines HK2

Nous avons aussi testé l'effet des levures enrichies en sélénométhionine sur la viabilité des cellules rénales humaines. Le pourcentage de survie cellulaire est représenté dans la figure 132.

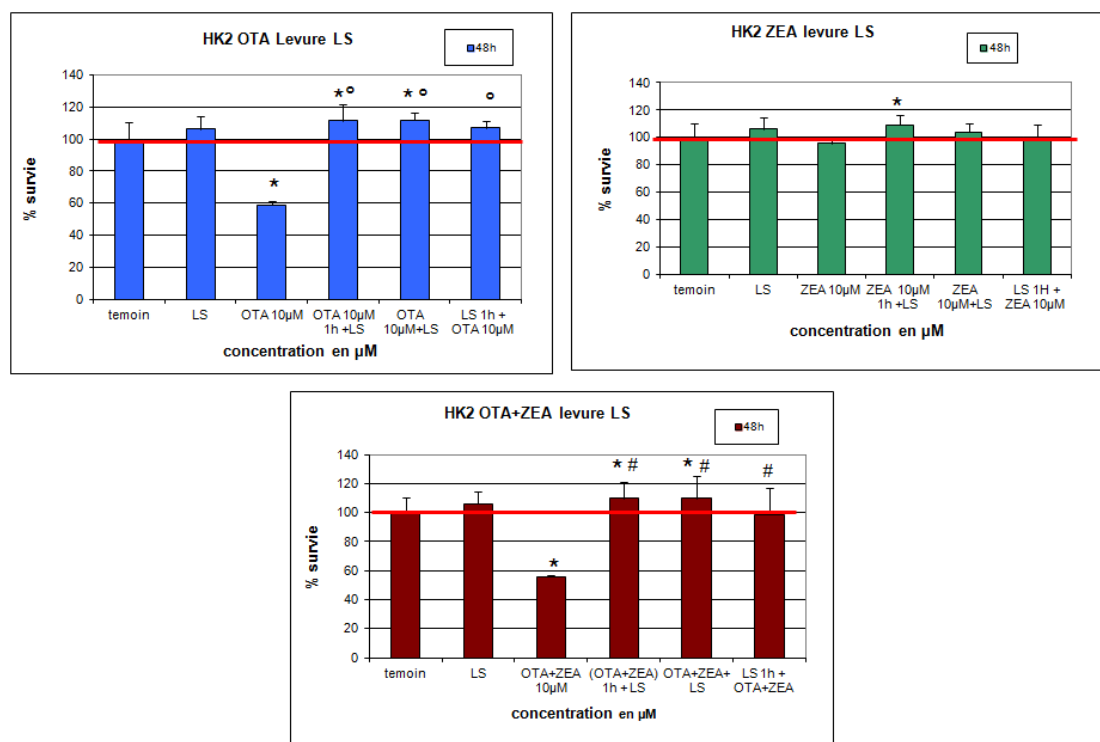


Figure 132 : Comparaison du taux de survie des cellules rénales humaines (HK2) en fonction du temps d'introduction des levures sélénées et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA). \* différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ; @ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ; # différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA.

La levure sélénée seule ou combinée à la ZEA n'a aucun effet sur la viabilité cellulaire des HK2. Lorsque la ZEA est introduite 1h avant la levure, une légère prolifération cellulaire est observée. Par contre, l'effet cytotoxique dû à l'OTA ou à la co-exposition OTA +ZEA est réversée par les levures sélénées. Lorsque les cellules sont exposées aux toxines une heure avant l'ajout de la levure ou simultanément à la levure, on note même une prolifération cellulaire. Le différentiel de viabilité est d'environ 53% (57% versus 110%). Si la levure est introduite une heure avant les toxines, la viabilité cellulaire est identique à celle témoin. Les levures sélénées réversent totalement l'effet cytotoxique de l'OTA.

Si on compare l'effet des levures sélénées à l'effet de la sélénométhionine pure, on constate que le schéma est complètement différent : effet protecteur avec les levures sélénées, aucun effet avec la sélénométhionine vis-à-vis de la cytotoxicité provoquée par l'OTA. De même la sélénométhionine aggrave l'effet cytotoxique de l'OTA+ZEA alors que les levures sélénées ne modifient rien. Ceci indique donc clairement que l'effet protecteur des levures sélénées n'est pas uniquement dû à la sélénométhionine.



### 1.2.3 Effet des toxines (OTA, ZEA) en présence de levures enrichies en glutathion (LGSH) sur la viabilité des cellules mammaires humaines (MCF7)

Nous avons évalué la survie des cellules mammaires humaines (MCF7) exposées à l'OTA et/ou de ZEA en présence des levures enrichies en glutathion (figure 133).

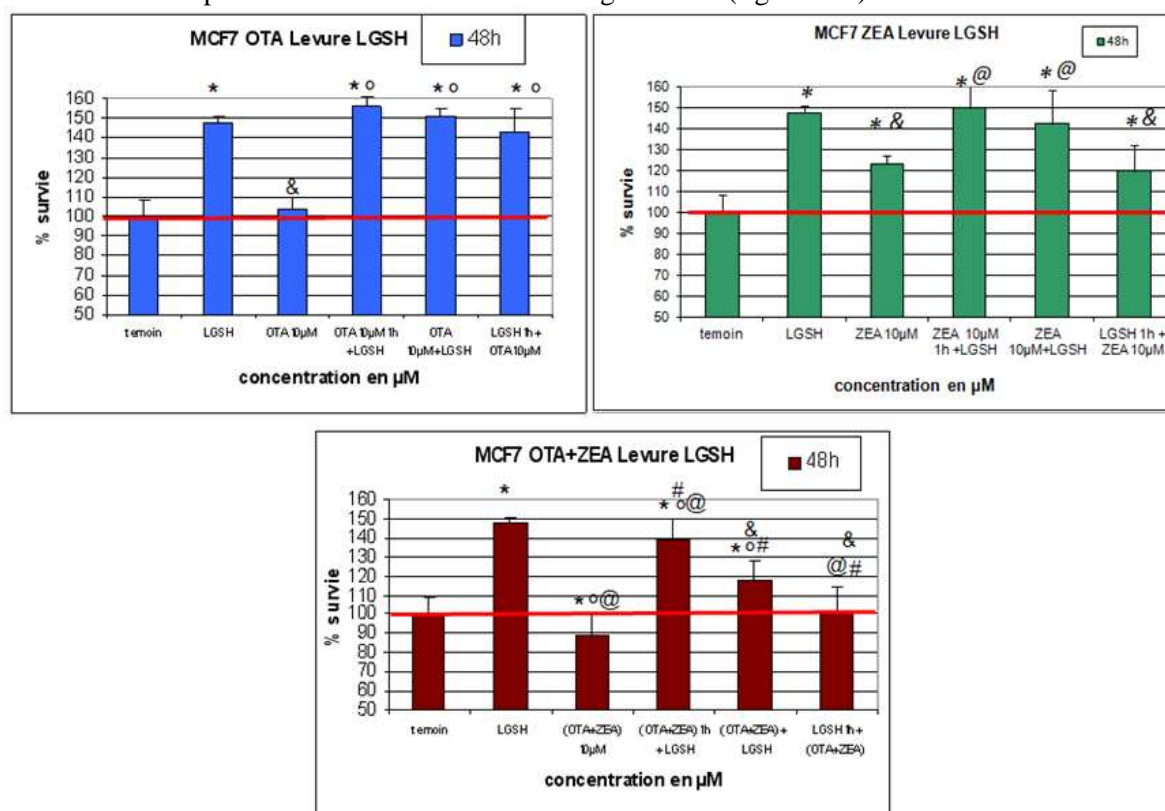


Figure 133 : Comparaison du taux de survie des cellules humaines de glandes mammaires (MCF7) en fonction du temps d'introduction des levures enrichies en glutathion et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA). \* différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ; @ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ; # différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA ; & différence significative par rapport à exposition à levure GSH seule.

Les levures enrichies en glutathion par elles même provoquent une prolifération cellulaire des cellules MCF7 (150% versus 100%). L'exposition des cellules à l'OTA ne modifie pas l'effet proliférateur engendré par les levures. Il n'y a pas de différence significative entre les cellules exposées simultanément à l'OTA et la levure ou celles exposées d'abord à la toxine ni celles exposées d'abord à la levure, même si une légère tendance à la baisse soit observée lorsque les levures sont ajoutées avant l'OTA. L'effet proliférateur n'est donc dû dans ce cas qu'aux levures.

Quand la ZEA est introduite 1h avant la levure ou en même temps, l'effet proliférateur observé est similaire à l'effet induit par la levure seule. Lorsque la levure est introduite 1h avant la ZEA, on note une prolifération moins importante, mais cependant identique à celle observée lorsque les cellules ne sont exposées qu'à la ZEA. La levure enrichie en GSH reverse l'effet cytotoxique engendré par la présence simultanée des deux toxines (OTA+ZEA). L'effet est plus marqué lorsque la toxine est introduite 1h avant la levure.

### 1.2.4 Effet des toxines (OTA, ZEA) avec les levures enrichies en sélénométhionine (LS) sur les cellules mammaires humaines (MCF7)

L'effet des levures sélénisées sur la viabilité des cellules mammaires humaines exposée à l'OTA et/ ou ZEA) est schématisé dans la figure 134.

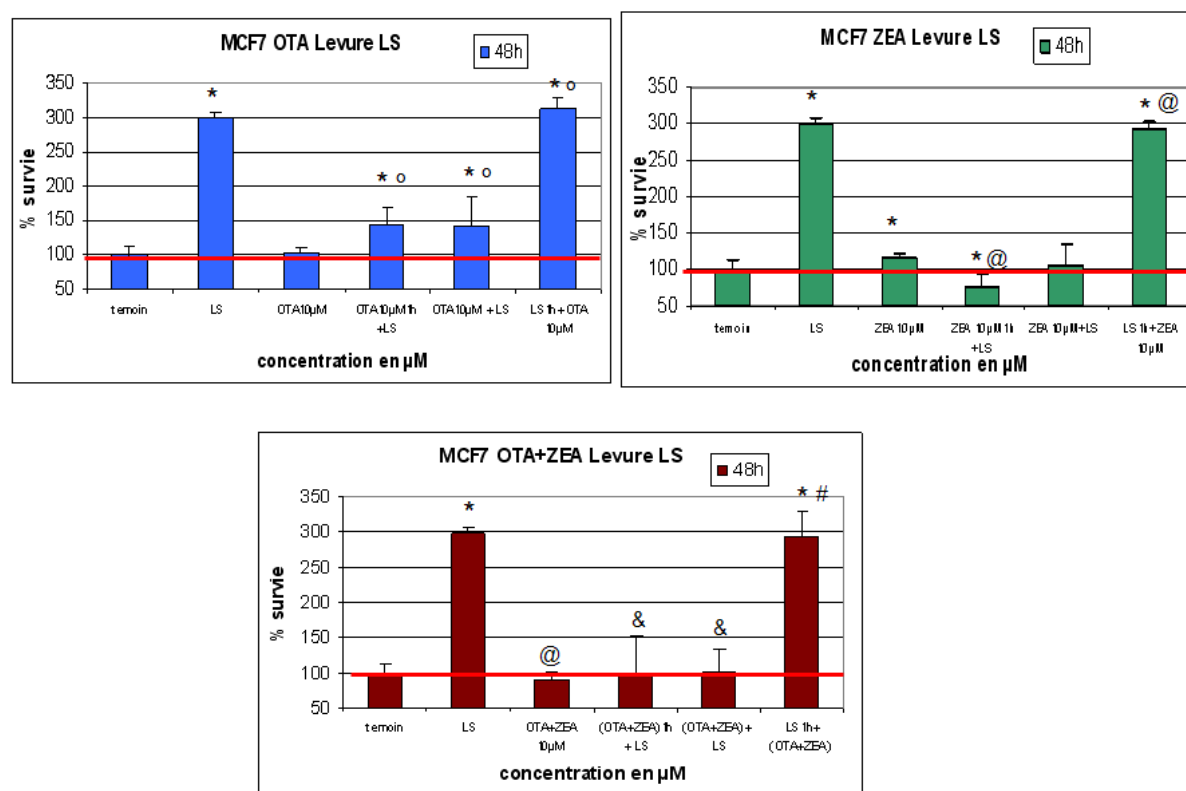


Figure 134 : Comparaison du taux de survie des cellules humaines de glandes mammaires (MCF7) en fonction du temps d'introduction des levures sélénisées et des toxines (OTA, ZEA et OTA+ZEA). \* différence significative par rapport au témoin sans aucun traitement ; ° différence significative par rapport à exposition à OTA seule ;@ différence significative par rapport à exposition à ZEA seule ;# différence significative par rapport à exposition à OTA + ZEA ; & différence significative par rapport à exposition à levure GSH seule.

La levure sélénisée provoque par elle-même une prolifération cellulaire spectaculaire (3 fois). Lorsque la levure sélénisée est introduite 1h après ou en même temps que l'OTA, la prolifération cellulaire est moins importante que lorsqu'il n'y a que la levure (150% versus 300%). L'OTA réduit l'effet proliférateur. Par contre, si la levure sélénisée est introduite 1h avant la toxine, l'OTA n'a plus aucun effet puisque la prolifération cellulaire est équivalente à celle observée lorsqu'il n'y a qu'exposition à la levure sélénisée.

Lorsque les cellules sont exposées à la ZEA 1h avant l'ajout de la levure sélénisée, il n'y a plus de prolifération, mais une cytotoxicité (60% viabilité versus 300 % levure seule ; versus 123% ZEA seule).

L'ajout simultanée de la levure LS et la ZEA ne modifie pas la viabilité cellulaire qui est équivalente à celle des cellules exposées à la ZEA seule.

Quand la levure est ajoutée 1h avant la ZEA, on note une prolifération cellulaire similaire à celle induite par la levure seule.

La levure sélénisée a peu d'impact sur l'effet de l'OTA+ZEA lorsque les toxines sont ajoutées avant ou au même moment que la levure.

Lorsque la levure est introduite 1h avant, on note une prolifération cellulaire semblable à celle observée lorsque les cellules ne sont exposées qu'à la levure seule.



### **1.2.5 Conclusion sur la cytotoxicité**

La comparaison entre les effets des antioxydants purs (GSH ; sélénométhionine) avec les levures correspondantes montrant que les effets observés avec les levures ne sont pas dus exclusivement à la présence du GSH ou de la sélénométhionine. Il est important de noter qu'un même produit ou une même levure en présence des toxines modifiera la viabilité cellulaire de manière contradictoire suivant le type cellulaire.

Ainsi les cellules rénales sont sensibles à l'OTA (cytotoxicité) légèrement contrecarrée par le GSH pur, mais pas par les levures GSH. Ces cellules sont insensibles à la ZEA, qui par contre devient cytotoxique en présence de GSH. Un effet synergique est observé quand les cellules rénales sont exposées simultanément à une quantité équivalente d'OTA/ZEA et GSH. Cette synergie n'est pas observée avec les levures GSH.

Les cellules des glandes mammaires sont quant à elle sensible à la ZEA (prolifération). Cette prolifération est contrecarrée jusqu'à engendrer une cytotoxicité en présence de GSH pur. Ce phénomène n'est pas observé avec les levures GSH. Ces cellules sont insensibles à l'OTA seul, par contre l'exposition simultanée avec le GSH pur induit une prolifération cellulaire.

La comparaison exposition à la sélénométhionine ou aux levures sélénisées conduit aux mêmes conclusions qu'avec le GSH. Ainsi la sélénométhionine n'améliore pas l'effet cytotoxique induit par l'OTA alors que les levures sélénisées inhibent la cytotoxicité de l'OTA sur les HK2, on observe même une prolifération. La sélénométhionine inhibe la prolifération cellulaire induite par la ZEA alors que les levures sélénisées n'ont cet effet que si elles sont ajoutées 1h après la ZEA sur les cellules MCF7.

## **1.3 Evaluation de la génotoxicité (formation d'adduits à l'ADN) sur les cellules (HK2 et MCF7)**

Nous avons testé l'influence du glutathion pur; de la levure glutathion; de la sélénométhionine pure ou de la levure sélénisée sur la génotoxicité induite par l'OTA et/ou de la ZEA dans cellules HK2 et MCF7. Les concentrations en toxines et en antioxydant étaient de 10  $\mu$ M.

### **1.3.1 Effet sur les cellules rénales ( HK2)**

#### **1.3.1.1 Effet GSH/ SE/levures GSH/Levure sélénisée sur la génotoxicité de l'OTA**

Après 7h d'exposition, l'OTA forme principalement les deux adduits (Q1, Q2) provenant de l'OTHQ (ochratoxine quinone).

Le GSH pur tout comme la levure GSH inhibent la formation des adduits Q1 & Q2 (figure 135).

Par contre ni la sélénométhionine et ni la levure sélénisée n'empêche la formation des deux adduits liés à la forme quinone (Q1 ; Q2) mais elles favorisent la formation de l'adduit C-C8dG OTA.

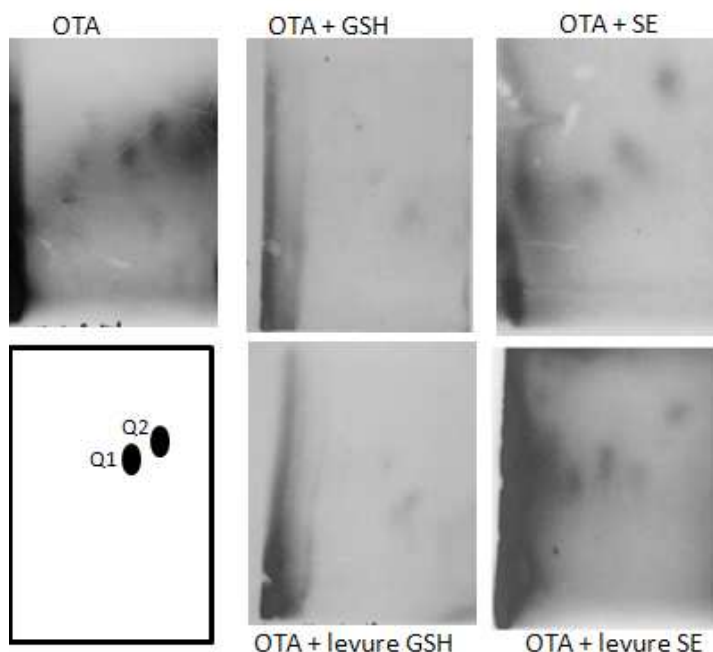


Figure 135 : Profils d'adduits à l'ADN des cellules rénales humaines HK2 exposées à l'OTA (10 $\mu$ M) en présence GSH (10 $\mu$ M) /SE (10 $\mu$ M) /Levures GSH (10 $\mu$ M) /levures sélénée (10 $\mu$ M)

#### 1.3.1.2 Effet GSH/ SE/levures GSH/Levure sélénée sur la génotoxicité de la ZEA

La ZEA après 7h d'exposition conduit à la formation de deux adduits (Z1, Z2) (figure 136). Le glutathion seul inhibe la formation d'un seul des adduits engendré par la ZEA, alors que la levure enrichie en GSH inhibe la formation des deux adduits. La sélénométhionine pur non seulement ne diminue pas la génotoxicité de la ZEA mais l'amplifie (apparition de nouveaux adduits). Par contre, la levure sélénée diminue considérablement la génotoxicité de la ZEA bien que l'adduit Z2 persiste mais à un taux considérablement moindre.

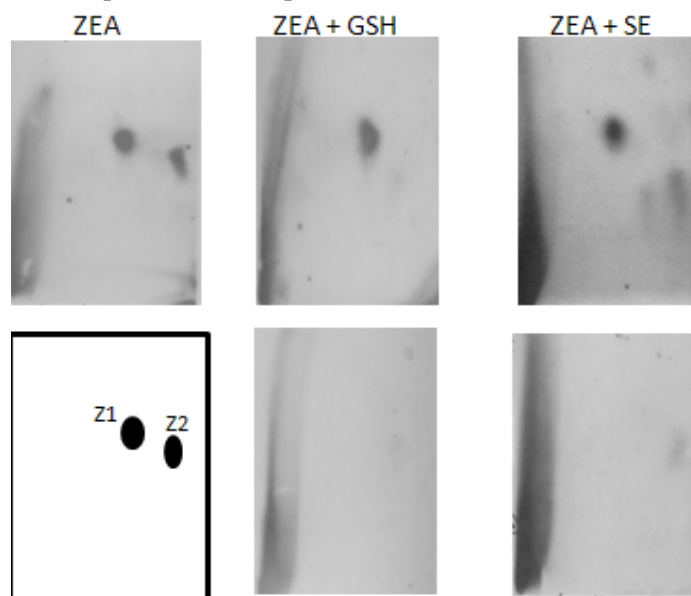


Figure 136 : Profils d'adduits à l'ADN des cellules rénales humaines HK2 exposées à la ZEA (10 $\mu$ M) en présence GSH (10 $\mu$ M) /SE(10 $\mu$ M) /Levures GSH(10 $\mu$ M) /levures sélénée(10 $\mu$ M).

### 1.3.1.3 Effet GSH/ SE/levures GSH/Levure sélénée sur la génotoxicité combinée de la ZEA et de l'OTA

L'exposition des cellules rénales simultanément à la ZEA + l'OTA conduit à la formation de l'adduit C-C8dG OTA (figure 137).

Le glutathion et la sélénométhionine diminuent la génotoxicité, bien que l'adduit C-C8dG OTA persiste. L'inhibition de la génotoxicité est totale avec la levure GSH, par contre avec la levure sélénée les deux adduits de la ZEA sont formés. L'adduit C-C8dG OTA persiste bien qu'à un moindre degré.

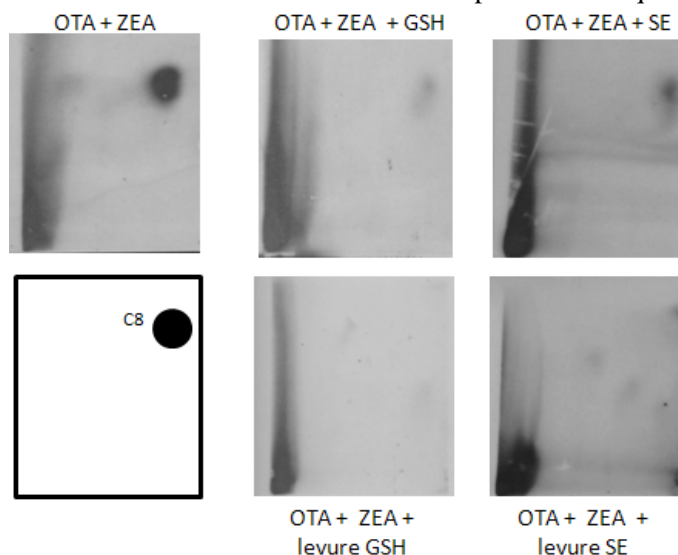


Figure 137 : Profils d'adduits à l'ADN des cellules rénales humaines HK2 exposées ZEA (10 $\mu$ M) + OTA(10 $\mu$ M) en présence GSH(10 $\mu$ M)/SE(10 $\mu$ M)/Levures GSH(10 $\mu$ M)/levures sélénée(10 $\mu$ M)

## 1.3.2 Sur les cellules MCF7

### 1.3.2.1 Effet GSH/ SE/levures GSH/Levure sélénée sur la génotoxicité de l'OTA

Dans les cellules humaines de glandes mammaires, l'OTA induit la formation principalement d'un adduit correspondant à Q1 (figure 138). Le GSH pur diminue la formation de l'adduit Q1 mais stimule la formation de l'adduit C-C8dG OTA.

La sélénométhionine tout comme la levure sélénée et la levure GSH éliminent totalement les adduits de l'OTA.

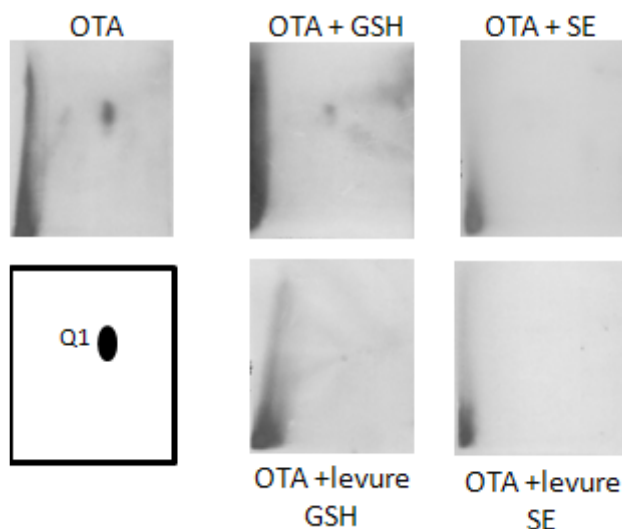


Figure 138 : Profils d'adduits à l'ADN des cellules mammaires humaines (MCF7) exposées à l'OTA (10 $\mu$ M) en présence GSH (10 $\mu$ M)/SE (10 $\mu$ M)/Levures GSH (10 $\mu$ M)/levures sélénée (10 $\mu$ M).

### 1.3.2.2 Effet GSH/ SE/levures GSH/Levure sélénée sur la génotoxicité de la ZEA

La ZEA 10 $\mu$ M induit à la formation de 3 adduits (Z1, Z2, Z3) sur les cellules (MCF7) (figure 139). Le GSH et la sélénométhionine inhibe la génotoxicité de la ZEA.

La levure GSH amplifie l'adduit Z3 alors qu'elle inhibe la formation des deux autres. La levure sélénée inhibe totalement l'adduit Z3 et diminue les deux autres.

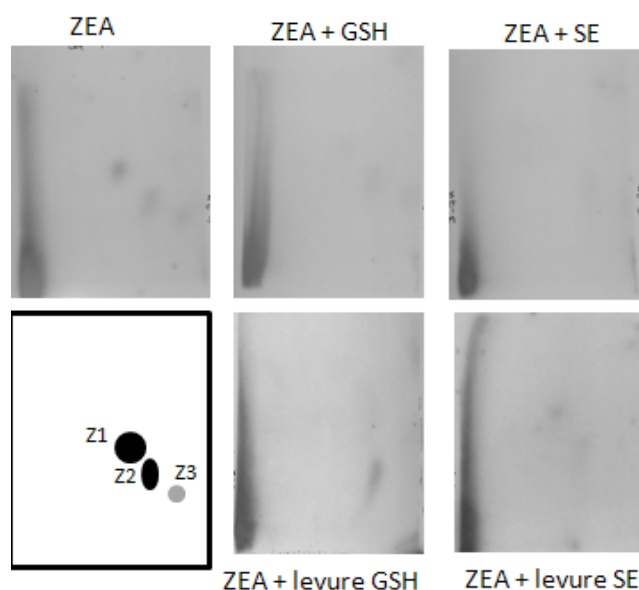


Figure 139 : Profils d'adduits à l'ADN des cellules mammaires humaines (MCF7) exposées à la ZEA) en présence GSH (10 $\mu$ M)/SE (10 $\mu$ M)/Levures GSH (10 $\mu$ M)/levures sélénée (10 $\mu$ M).

### 1.3.2.3 Effet GSH/ SE/levures GSH/Levure sélénée sur la génotoxicité combinée de la ZEA et de l'OTA

L'exposition des cellules MCF7 au mélange ZEA (10 $\mu$ M) +OTA (10 $\mu$ M) conduit à la formation de 4 adduits, dont deux dérivent de l'OTA (Q1 & C8) et deux dérivent de la ZEA (Z1, Z2) (figure 140). Avec le glutathion seul ou la levure enrichie en glutathion, les adduits initiaux disparaissent, l'adduit Z3 apparaît. Avec la sélénométhionine et la levure sélénée, les deux adduits de la ZEA (Z1, Z2) persistent alors que les adduits de l'OTA diminuent (Q1) ou disparaissent (C8).

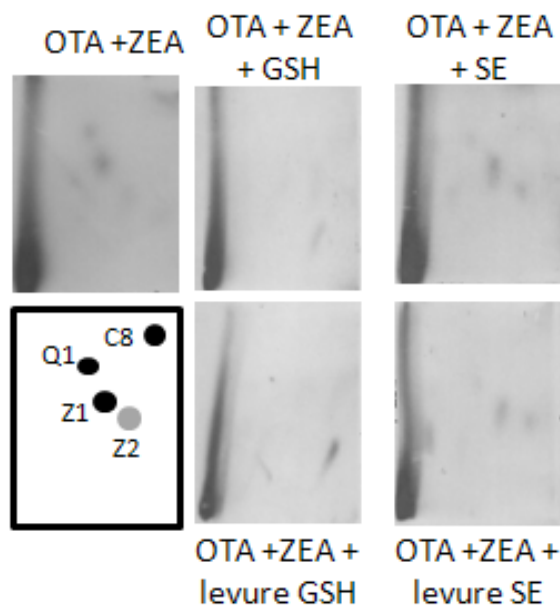


Figure 140 : Profils d'adduits à l'ADN des cellules humaines des glandes mammaires (MCF7) exposées à la ZEA+OTA en présence GSH (10 $\mu$ M) /SE(10 $\mu$ M) /Levures GSH(10 $\mu$ M)/levures sélénée(10 $\mu$ M).

### **1.3.3 Conclusion sur la génotoxicité**

Comme précédemment lors de l'analyse de la viabilité cellulaire on constate que la réponse varie en fonction du type cellulaire, de la mycotoxine et de l'agent antioxydant.

Il est intéressant de noter que les deux types cellulaires sont sensibles aux deux mycotoxines indiquant que les mécanismes mis en jeu dans la survie cellulaire et dans la génotoxicité sont différents.

Le GSH protège de la génotoxicité de l'OTA dans les cellules HK2 mais pas dans les cellules MCF7, alors qu'on note l'inverse pour la ZEA.

La sélénométhionine protège de la génotoxicité de l'OTA et de la ZEA uniquement dans les cellules MCF7, alors que qu'il y a amplification aussi bien de la génotoxicité de l'OTA que de la ZEA dans les cellules HK2.

La levure glutathion protège aussi bien de la génotoxicité de l'OTA que de la ZEA et ce dans les deux types cellulaires.

La levure sélénée a un effet négatif vis-à-vis de la génotoxicité de l'OTA dans les cellules rénales, alors que ces mêmes levures protègent de la génotoxicité de l'OTA dans les MCF7 et de la ZEA dans les deux types de cellules.

En plus de l'inhibition de la génotoxicité, on observe notamment lors de la co-exposition (OTA/ZEA) à une modification du profil des adduits. Par exemple la levure sélénée dans les cellules rénales conduit à une atténuation nette de la formation de l'adduit C-C8dG dérivant de l'OTA et qui est seul à être formé quand il ya exposition OTA/ZEA, mais favorise la formation de deux adduits de la ZEA.

La modification des profils d'adduits est la conséquence d'une modification de la biotransformation des mycotoxines. C'est pourquoi nous avons analysés les métabolites formés dans les cellules.

### **1.4 Analyse des métabolites d'OTA formés dans les cellules rénales (HK2) et de glandes mammaires (MCF7) traitées avec GSH/SE/Levures GSH /levures sélénées**

Comme nous avons observé des différences entre les profils d'adduits sur les deux types cellulaires en fonction de la toxine testée, nous avons recherché les profils métaboliques.

#### **1.4.1 Au niveau des cellules rénales humaines HK2**

##### **1.4.1.1 Exposition à l'OTA**

Nous avons comparé le profil des métabolites dans les cellules HK2 exposées 7h à l'OTA en présence ou non de glutathion pur ou de levure enrichie en glutathion, ou de sélénométhionine pur ou de levure sélénée.

Après 7h d'exposition nous observons la formation de 6 métabolites d'OTA en quantité importante ; l'OTHQ-GSH (dérivé de l'ochratoxine quinone conjugué au glutathion) ; l'OTHQ-NAC (dérivé de l'ochratoxine quinone conjugué à la N-acétylcystéine) ; le DC-OTHQ (ochratoxine quinone décarboxylée) ; OTHQ1 & 2 (ochratoxine quinone existant sous forme de deux isomères) ; le métabolite X de structure inconnue.

Nous constatons (figure 141 et 142) que les produits testés influencent différemment la métabolisation de l'OTA.

Lorsque les cellules sont traitées par le glutathion ou la levure GSH (figure 141), on constate une augmentation significative de la formation de DC-OTHQ et d'OTB alors que la quantité d'OTHQ-NAC diminue. Les profils métaboliques obtenus lors du traitement au GSH ou à la levure GSH sont similaires. Dans les deux cas on note l'apparition de 4 OH- OTA et 4 métabolites inconnus F ; I ; H ; Y. Le métabolite X quant à lui diminue.

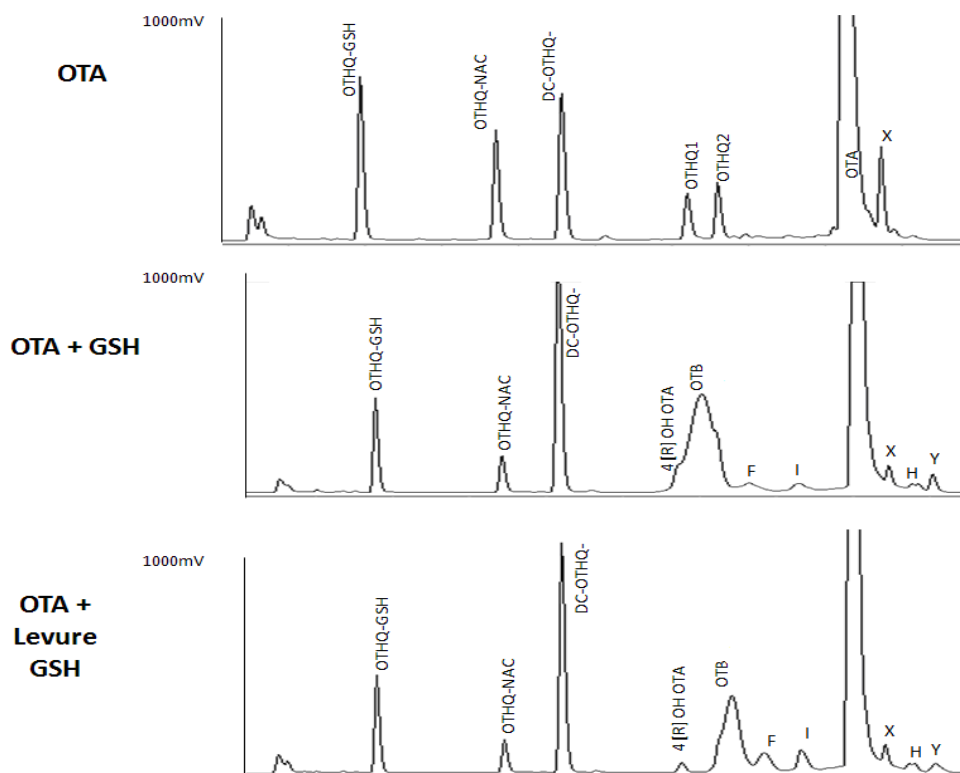


Figure 141 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à l'OTA ; OTA + GSH ; OTA + levure GSH. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min.

Après traitement des cellules par la sélénométhionine ou la levure sélénée (figure 142), on observe l'effet inverse avec augmentation de l'OTHQ-NAC, OTHQ1 ; apparition des métabolites I ; M ; G associée à une diminution de la formation de DC-OTHQ, d'OTHQ2 et OTHQ-GSH.

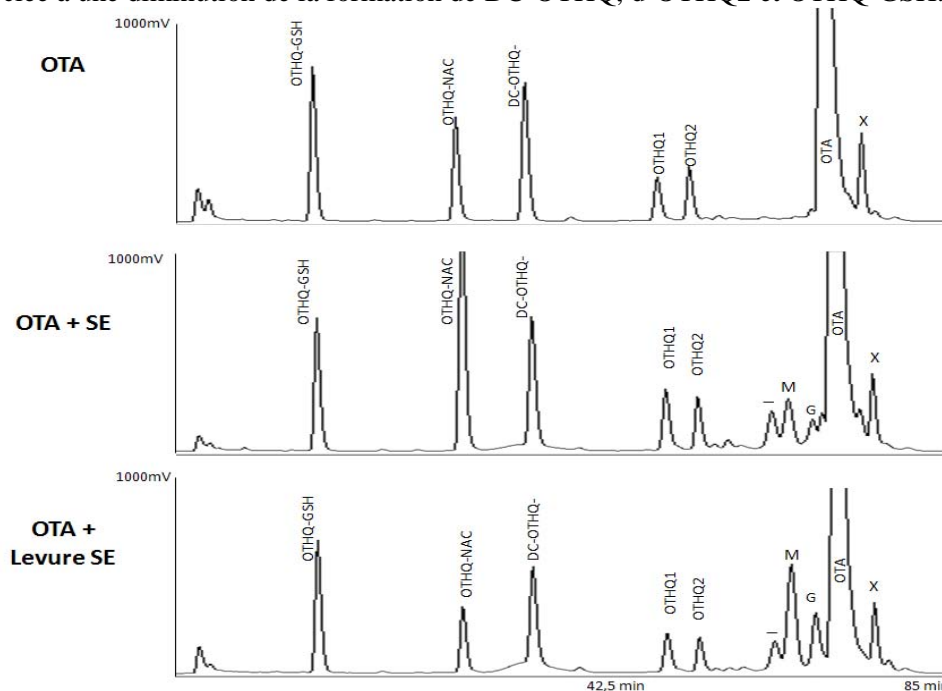


Figure 142 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à l'OTA ; OTA + SE ; OTA + levure SE. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min.

#### 1.4.1.2 Exposition à la ZEA

Les cellules HK2 métabolisent peu la zéaralénone en comparaison à la métabolisation de l'OTA. On observe 5 métabolites :  $\alpha$ -zol et les métabolites 1, 3, 7, 9 qui sont de nature inconnue. L'exposition au GSH ou à la levure GSH réduisent la métabolisation de la ZEA. Certains métabolites (1, 7, 9) disparaissent totalement. Les métabolites 3 et  $\alpha$ -zol sont considérablement diminués. Avec la levure GSH on note l'apparition du métabolite 12 (figure 143).

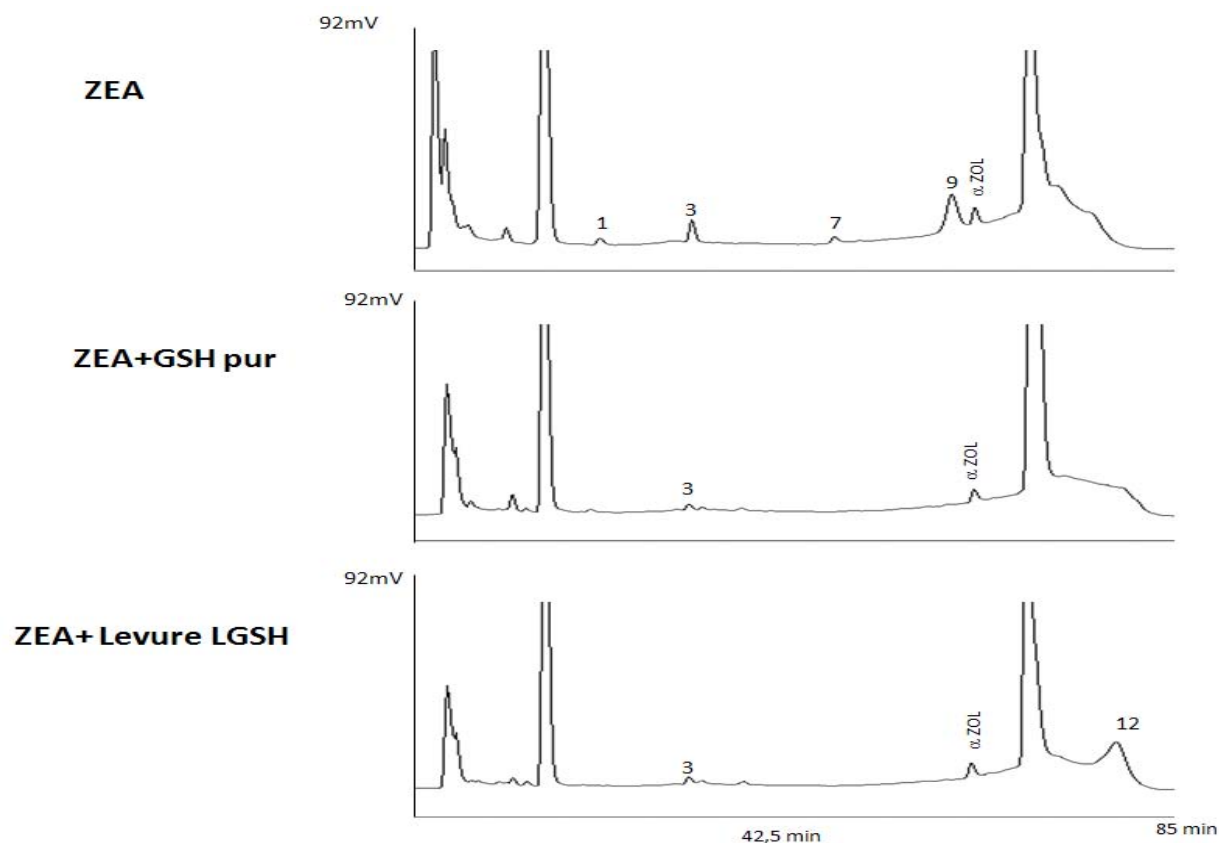


Figure 143 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à la ZEA ; ZEA + GSH ; ZEA + levure GSH. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élué par un gradient pendant 85min.

Lorsque les cellules sont exposées à la sélénométhionine (figure 144), un grand nombre de métabolites de ZEA sont formés (13). Deux sont identifiés et correspondent au  $\beta$ -zol et  $\alpha$ -zol. Par contre, le profil obtenu lors de l'exposition à la levure sélénée est similaire à celui obtenu à l'exposition des cellules à la ZEA seul. Il semblerait que dans ce cas de figure la présence de sélénométhionine sur la levure ne modifie pas le métabolisme de la ZEA.

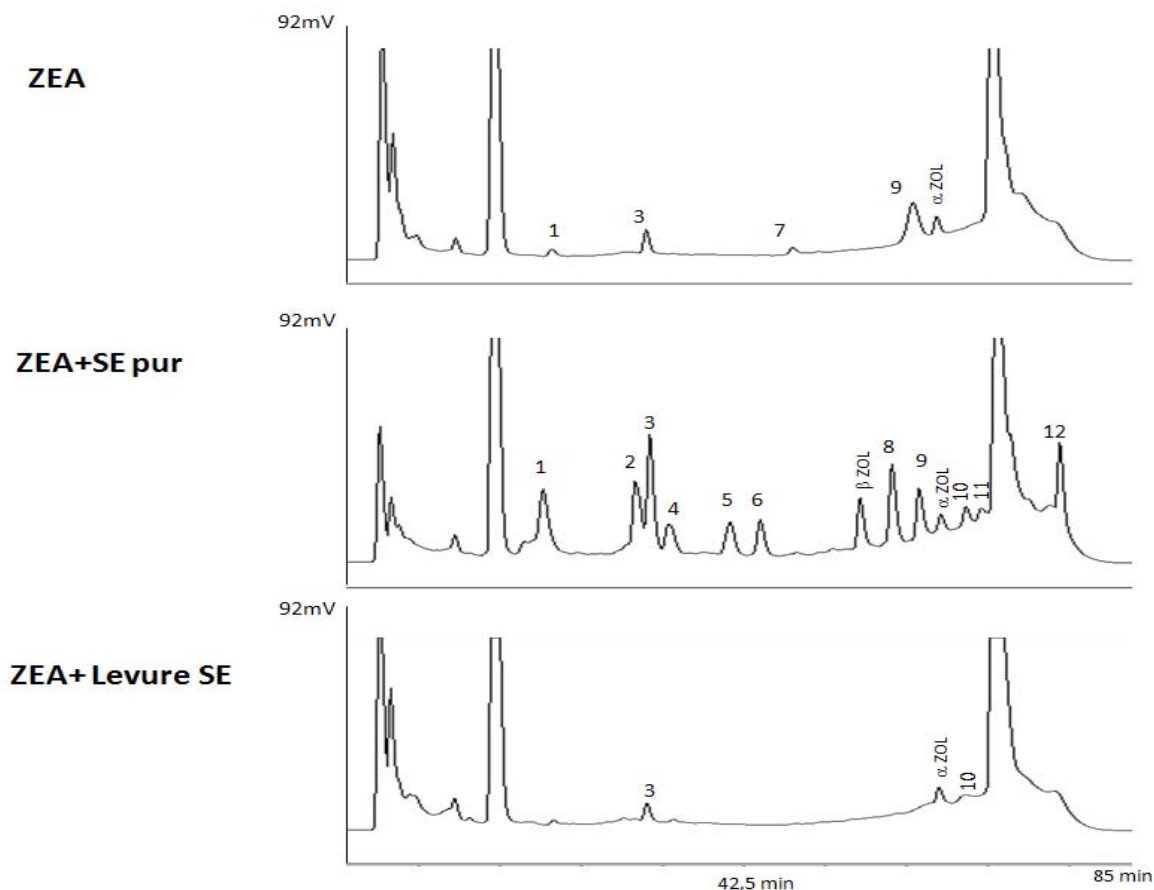


Figure 144 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à la ZEA ; ZEA + SE ; ZEA + levure SE. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élué par un gradient pendant 85min.



### 1.4.1.3 Exposition simultanée à l'OTA+ZEA

Les métabolites obtenus lors de l'exposition des cellules rénales humaines à l'OTA+ZEA en présence ou non de glutathion pur ; de sélénométhionine pur, ou des levures GSH ou sélénées sont représentés dans les figures 145 et 146.

La présence simultanée des deux toxines modifie la métabolisation de l'une par l'autre. La formation d'OTHQ-NAC ainsi que du métabolite X est amplifiée par la ZEA, alors que l'OTHQ1 ; l'OTHQ 2 et le DC-OTHQ ne sont plus formés. En parallèle on observe la formation du 4 [S] et 4 [R] OH-OTA, du métabolite I et Y.

Le profil métabolique de la ZEA est aussi modifié. La formation de l' $\alpha$ -zol est favorisée. Il y a apparition des métabolites 5 & 10. Une grande quantité du métabolite 8 est formé.

Lorsque les cellules sont traitées avec le GSH ou la levure GSH (figure 145), on observe une diminution des métabolites 5 et du 4 [R] OH-OTA ; une disparition du 4 [S] OH-OTA ; métabolite Y. On note une augmentation de l' $\alpha$ -zol ; de l'OTHQ-GSH ; et du métabolite X. Trois métabolites apparaissent : le DC-OTHQ ; et l'OTHQ2.

Les différences entre exposition au GSH pur et à la levure GSH se situe au niveau de l'OTHQ-NAC dont la formation diminue avec le GSH pur ; mais augmente avec la levure. Avec la levure il y a aussi disparition du métabolite 10 et moins de métabolite 8.

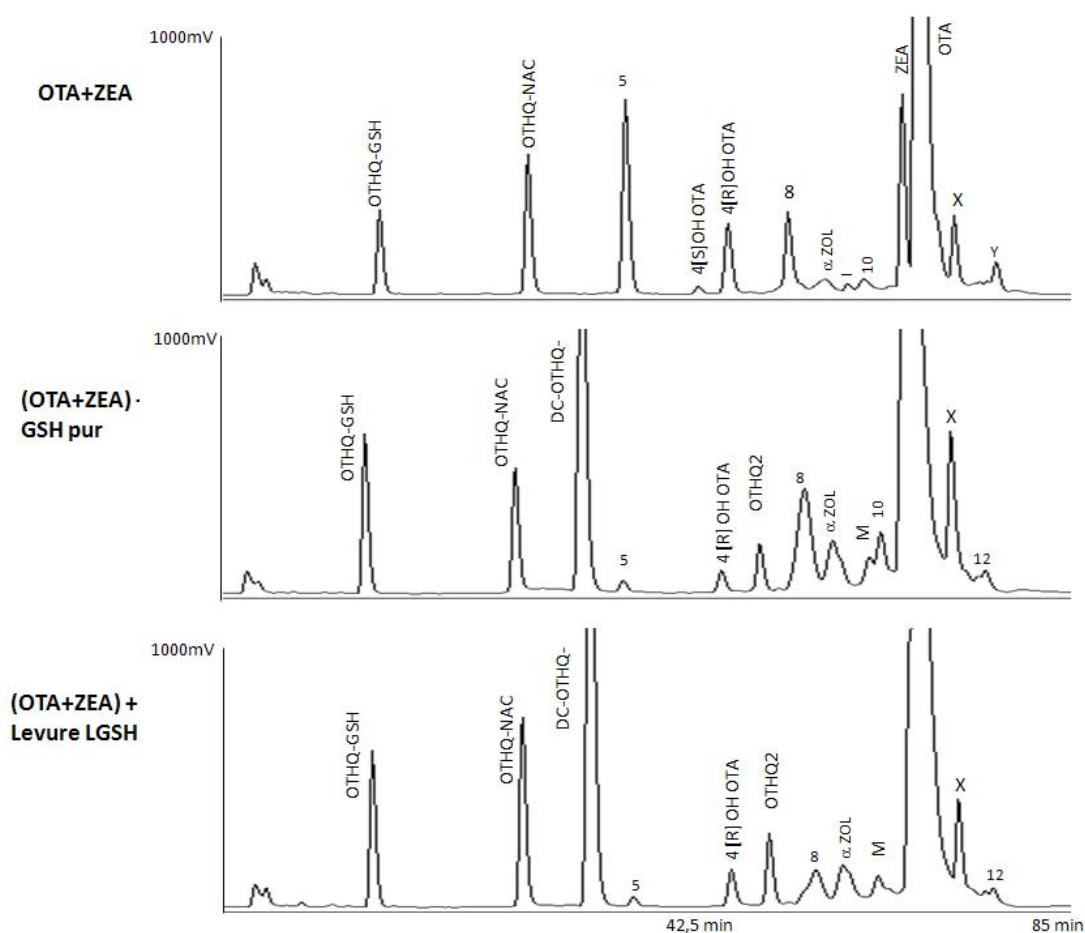


Figure 145 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à la ZEA+ OTA ; ZEA +OTA+ GSH ; ZEA +OTA+ levure GSH L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élué par un gradient pendant 85min.

L'exposition des cellules à la sélénométhionine ou aux levures sélénées simultanément aux toxines ne modifie pas le profil métabolique observé lorsque les cellules ne sont exposées qu'aux deux toxines (figure 146).

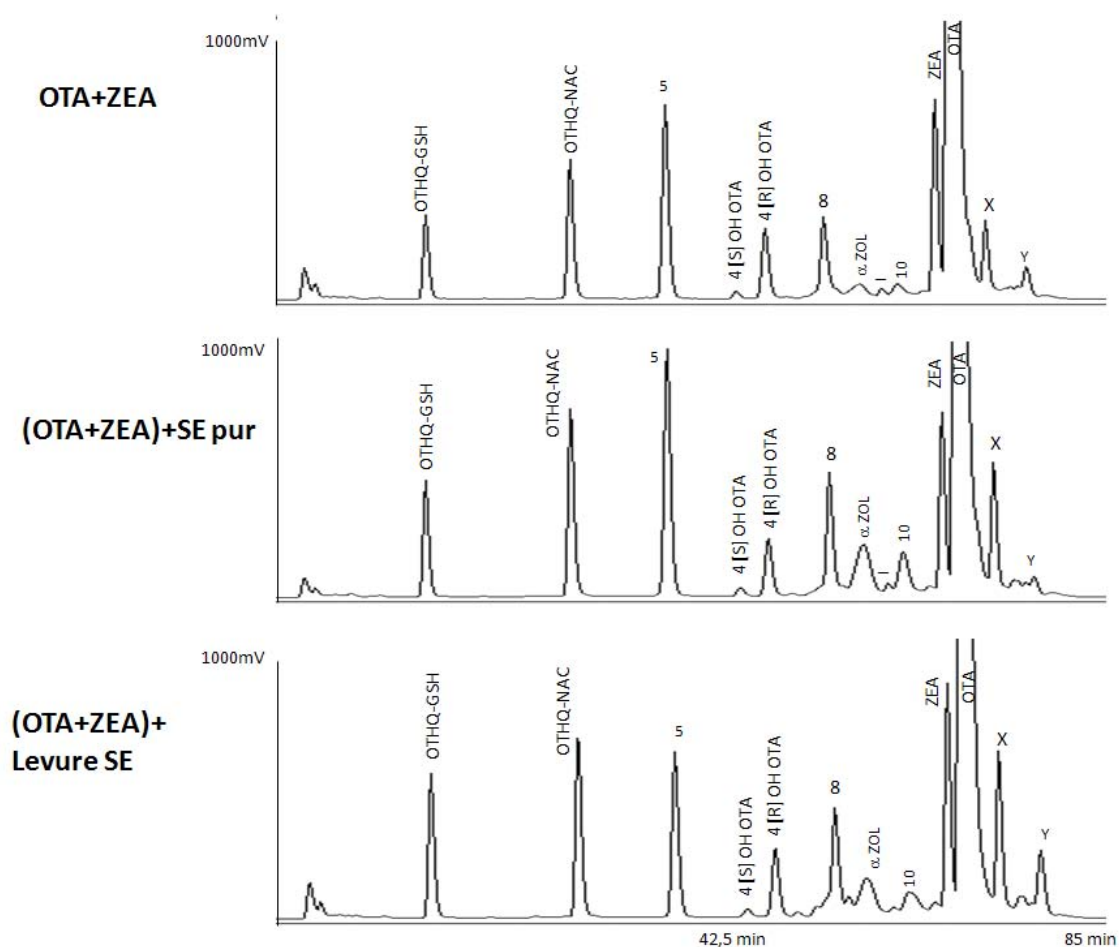


Figure 146 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à la ZEA+ OTA ; ZEA +OTA+ SE ; ZEA +OTA+ levure SE. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min.

### 1.4.2 Au niveau des cellules de glandes mammaires humaines (MCF7)

#### 1.4.2.1 Exposition à l'OTA

Les cellules mammaires humaines métabolisent beaucoup moins l'OTA que les cellules rénales. Trois métabolites sont formés en quantité importante : l'OTHQ-GSH ; OTHQ-NAC et DC-OTHQ. L'OTHQ1, le 4 [R] OH-OTA et les métabolites X ; H ; Y sont formés en petites quantités.

L'exposition au GSH et à la levure GSH (figure 147), diminue la formation des métabolites, à l'exception du métabolite Y qui est amplifié par les levures GSH. La formation de ce métabolite est aussi stimulée par les levures sélénisées. Il est donc probable que l'effet stimulateur soit dû à un constituant de la levure et non pas au GSH ou à la sélénométhionine.

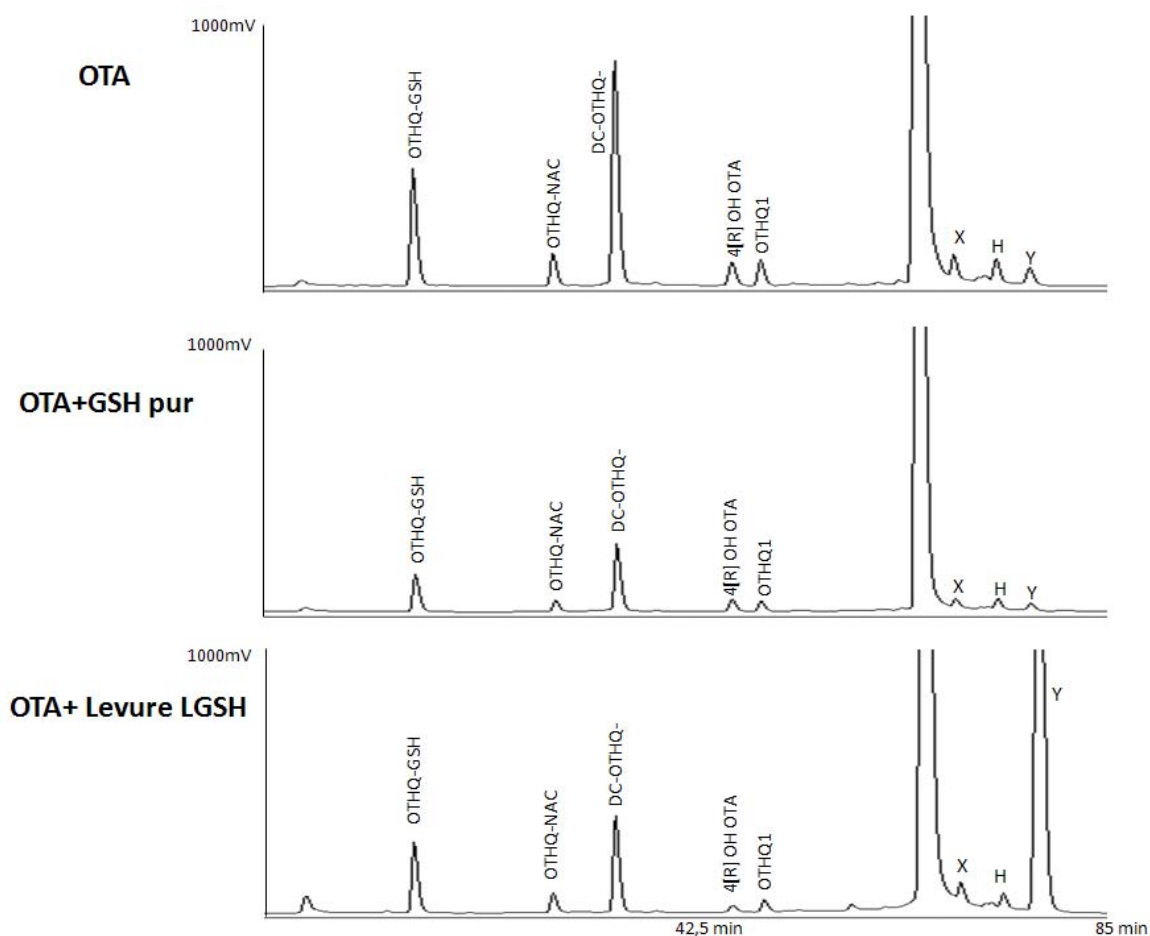


Figure 147 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules MCF7 exposées à l'OTA ; OTA + GSH ; OTA + levure GSH. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min.

La sélénométhionine et la levure sélénée diminuent la formation de tous les métabolites à l'exception du métabolite X qui est amplifié (figure 148).

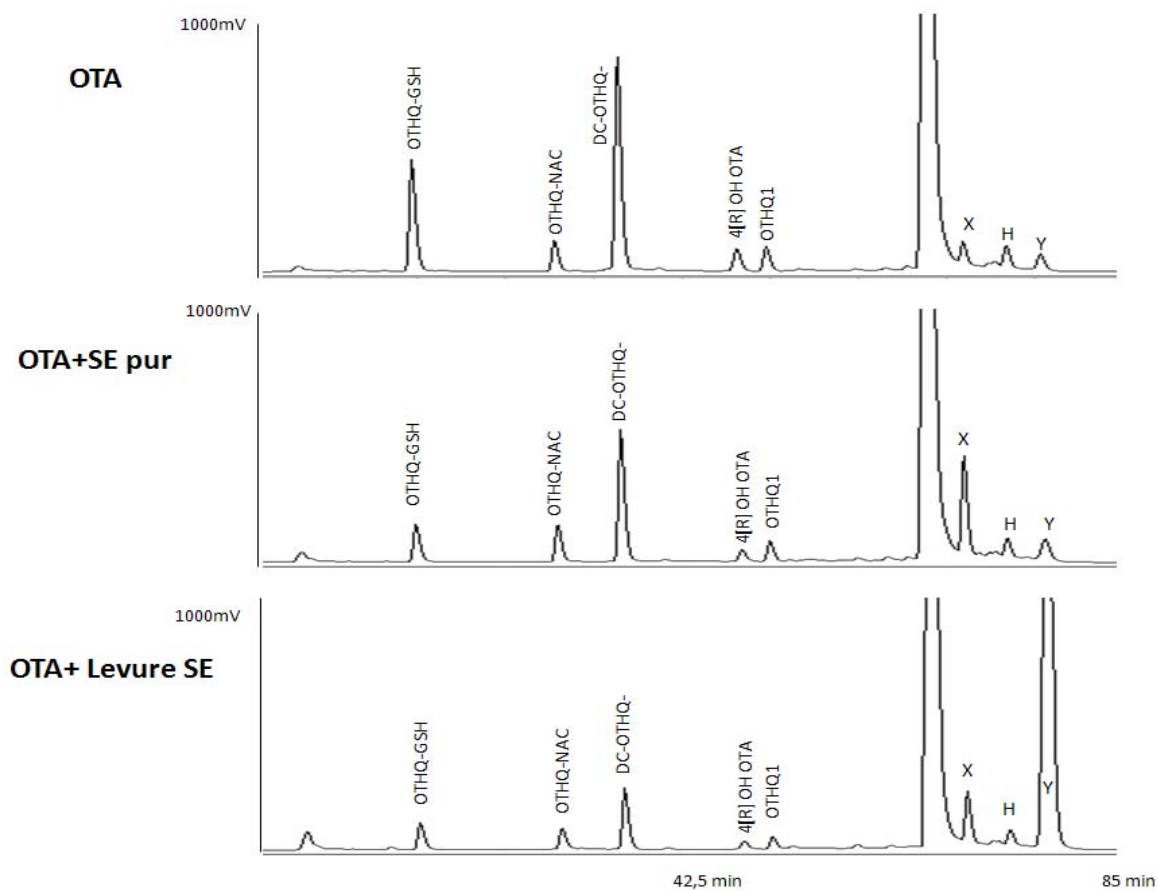


Figure 148 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules HK2 exposées à l'OTA ; OTA + SE ; OTA + levure SE. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élué par un gradient pendant 85min.

#### 1.4.2.2 Exposition à la ZEA

La ZEA est essentiellement métabolisée par les MCF7 en 2 métabolites l'  $\alpha$ -zéaralénone ( $\alpha$ -Zol) et  $\beta$ -zéaralénone ( $\beta$ -Zol).

Ni le GSH, ni la sélénométhionine ne modifie le métabolisme de la ZEA (figure 149 et 150). Les levures n'ont pas d'effet non plus.

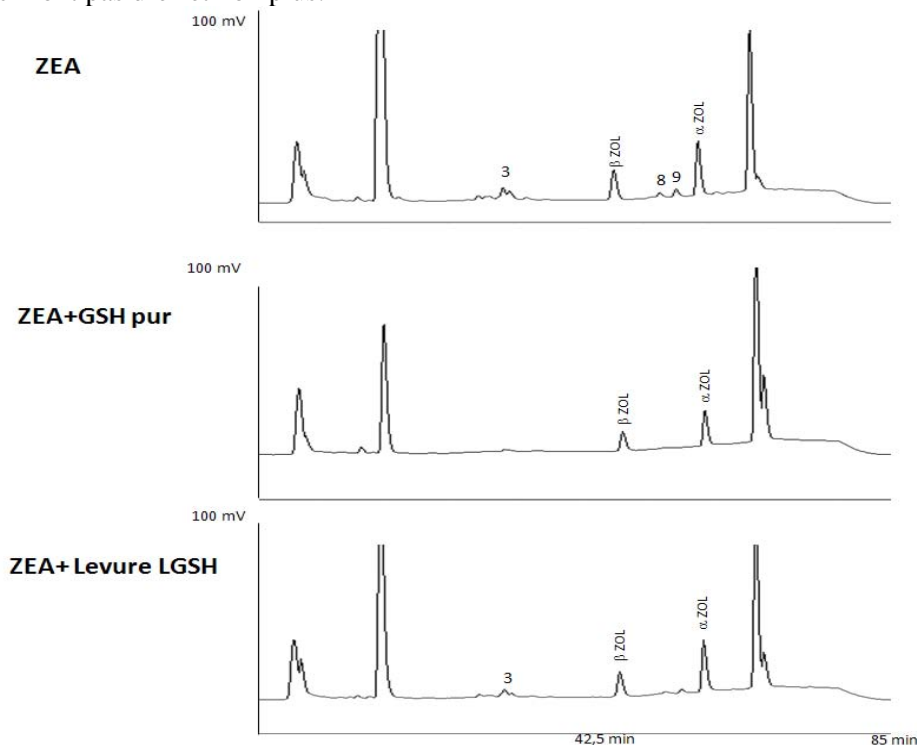


Figure 149 : Comparaison des métabolites formés par les cellules MCF7 exposées à la ZEA ; ZEA + GSH ; ZEA + levure GSH. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min.

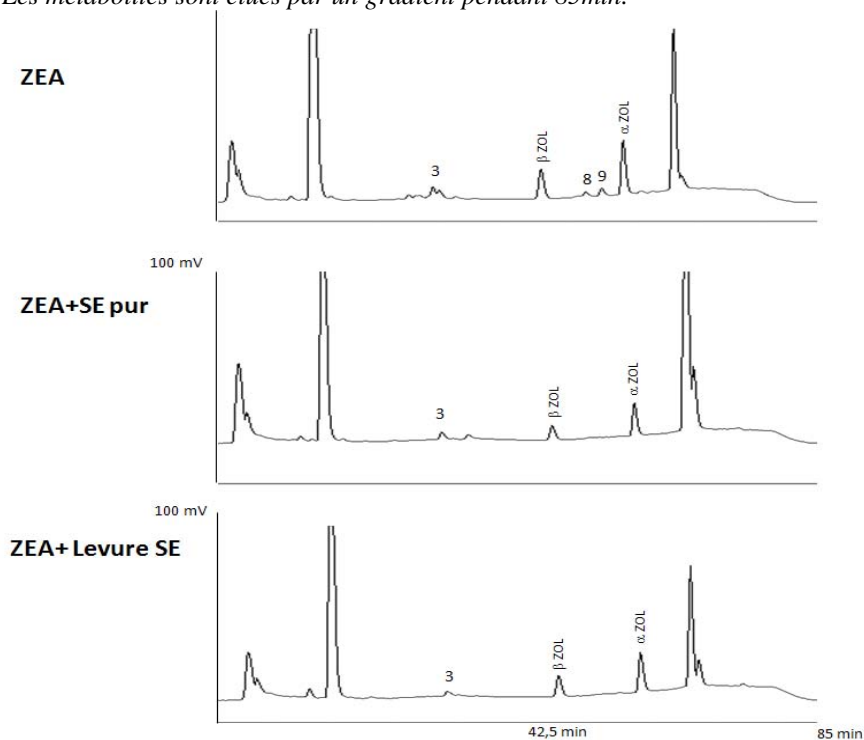


Figure 150 : Comparaison des métabolites formés par les cellules MCF7 exposées à la ZEA ; ZEA + SE ; ZEA + levure SE (bas). L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min.

### 1.4.2.3 Exposition à l'OTA+ZEA.

L'exposition des cellules MCF7 au mélange OTA+ ZEA conduit essentiellement à la formation des métabolites de l'OTA : l'OTHQ-GSH ; l'OTHQ-NAC ; le DC-OTHQ : l'OTHQ1 ; le 4 [R] OH-OTA et les métabolites X & Y. Le seul métabolite lié à la ZEA est le métabolite 12.

L'exposition au GSH et à la levure GSH diminue significativement la formation OTHQ-NAC. Par contre le taux de DC-OTHQ augmente considérablement (figure 151).

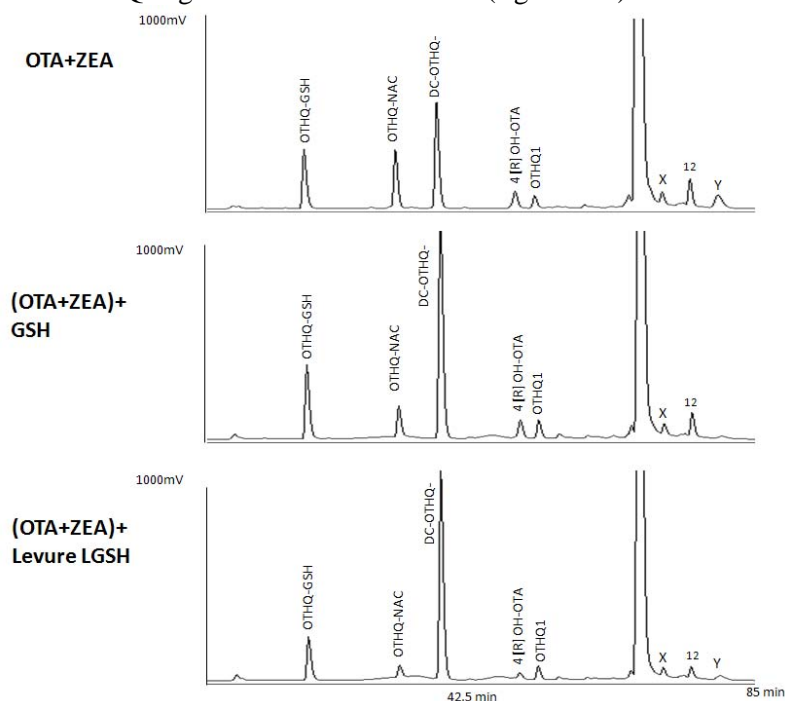


Figure 151 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules MCF7 exposées à l'OTA+ ZEA ; OTA +ZEA + GSH ; OTA + ZEA + levure GSH. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence. Les métabolites sont élués par un gradient pendant 85min

L'exposition à la sélénométhionine ou aux levures sélénées réduisent la formation de tous les métabolites, sauf le métabolite Y qui avec les levures sélénées augmente (figure 152).

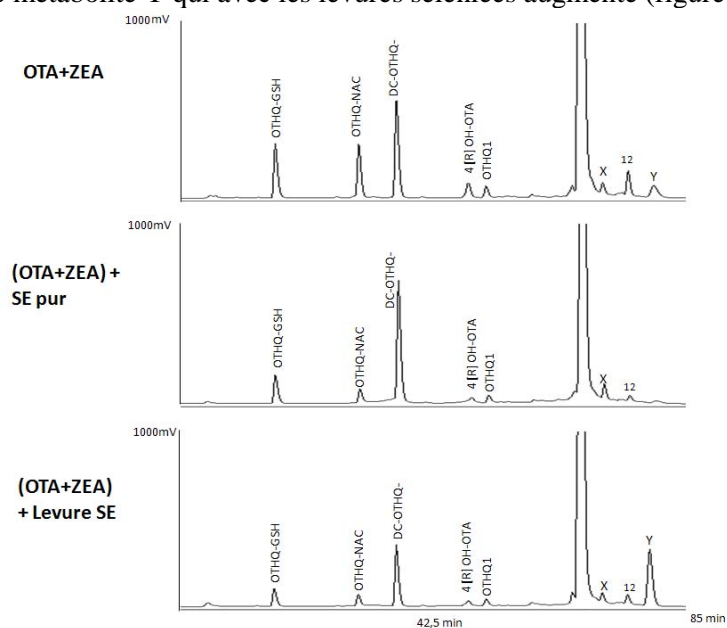


Figure 152 : Comparaison des métabolites formés dans les cellules MCF7 exposées à l'OTA+ ZEA ; OTA +ZEA + SE ; OTA + ZEA + levure SE. L'intensité est exprimée en unité arbitraire de fluorescence.

## 1.5 Corrélation entre métabolisation et génotoxicité

D'une manière générale, au niveau des cellules rénales, le GSH seul et la levure correspondante ont un effet bénéfique vis-à-vis de la génotoxicité de l'OTA ; par contre la sélénométhionine et la levure sélénée augmentent la génotoxicité de l'OTA et de la ZEA dans ces cellules. Dans les cellules des glandes mammaires, il y a suppression ou tout au moins une nette amélioration vis-à-vis de la génotoxicité des deux mycotoxines lorsque les cellules sont exposées à une seule mycotoxine simultanément au GSH, à la sélénométhionine et aux levures enrichies. Lorsque les cellules MCF7 sont exposées à la ZEA et à l'OTA, la sélénométhionine et les levures sélénées augmentent la génotoxicité.

L'ensemble de nos résultats confirment que le glutathion au niveau des cellules rénales interfère avec la génotoxicité de l'OTA et sa métabolisation. Un parallèle entre cette étude et l'étude réalisée dans notre laboratoire (Faucet-Marquis *et al.*, 2006) peut être faite. Ainsi le prétraitement de cellules rénales d'opossum (OK) par des modulateurs de la voie du glutathion montrait un lien entre l'augmentation de la métabolisation de l'OTA en OTB (forme déchlorée de l'OTA) ; en DC-OTHQ (forme quinone décarboxylée) ; en 4-OH-OTA au dépend de l'OTHQ, et la disparition des adduits dans ces cellules. Dans cette étude, l'exposition simultanée des cellules HK2 (cellules rénales humaines) à l'OTA et au GSH ou à la levure GSH conduit à augmenter la formation d'OTB, de 4-OH-OTA, de DC-OTHQ et à une réduction de la formation d'OTHQ simultanément à la disparition des adduits. A l'inverse le prétraitement des cellules OK par le MESNA stimulait la formation d'OTHQ, de l'OTHQ-NAC, du métabolite 16 (correspondant au métabolite M dans notre étude) et du métabolite 19 (correspondant au métabolite X dans notre étude) ainsi que la formation de plusieurs adduits à l'ADN dont le C-C8dG OTA.

Avec la sélénométhionine (pure ou sous forme de levures sélénées), le taux d'OTHQ ne diminue pas, par contre il y a augmentation de la formation d'OTHQ-NAC ainsi qu'apparition des métabolites M & X. Non seulement la génotoxicité n'est pas diminuée mais ce traitement stimule la formation du C-C8dG OTA. L'Acivicine qui inhibe la  $\gamma$ GT, enzyme nécessaire à la dégradation des dérivés GSH au niveau rénal, empêche la formation d'OTHQ-NAC et inhibe totalement la formation d'adduit dans les cellules OK. Ceci permet d'affirmer que la voie de métabolisation impliquée dans la formation de l'OTHQ-NAC est impliquée dans la génotoxicité de l'OTA. Ceci est en accord avec l'étude montrant que chez *E.coli* la cytotoxicité était corrélée à la formation d'un dérivé conjugué OTA- cystéine (Malaveille *et al.*, 1994). La métabolisation de l'OTA en OTHQ a clairement été mis en parallèle avec la génotoxicité (Tozlovanu *et al.*, 2006 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007, 2012).

La différence entre les cellules OK et les cellules HK2 réside dans l'absence de sulfoconjugaison dans les premières. Dans l'organisme le sélénium est substitué au soufre des acides aminés. Lequel soufre sert à la réaction de sulfoconjugaison. Le rôle de la sulfoconjugaison de l'OTA n'a pas été étudié bien qu'il semble évident que cette voie ait un rôle à jouer, puisque nous avons vu dans le chapitre précédent que l'OTA est beaucoup plus toxique pour les cellules OK (dépourvues de sulfoconjugaison) que pour les cellules rénales humaines. D'autre part, l'administration d'acivicine à des rats exposés à l'OTA élimine tous les adduits sauf l'adduit C-C8dG, qui n'était pas formé dans les mêmes conditions dans les cellules OK. La sélénométhionine est donc impliquée dans deux types de réaction de conjugaison/détoxification : d'une part *via* la glutathion peroxydase au niveau duquel le sélénium s'insère sous forme de sélénométhionine ou sélénocystéine (Combs & Gray 1998 ; Spallholz, 1994) et d'autre part dans les réactions de sulfoconjugaison, puisque la substitution du soufre par le sélénium favorise la synthèse du substrat sulfate.

La sulfo-conjugaison chez les mammifères est connue pour être une voie classique de détoxification et d'excrétion des xénobiotiques plus particulièrement des stéroïdes (Luu-The *et al.*, 1996). La ZEA est connue pour se fixer sur les récepteurs œstrogéniques grâce à sa conformation très proche de la 17  $\beta$ -œstradiol (Gaumy *et al.*, 2001). L'œstradiol sulfotransférase catalyse spécifiquement la sulfoconjugaison de la 17- $\beta$ -œstradiol en position 3'-OH (Falany *et al.*, 1997) alors qu'elle catalyse la sulfoconjugaison de la ZEA en position 4-OH du cycle phénol. La sélénométhionine pure a stimulé la métabolisation de la ZEA dans les cellules HK2, notamment de l' $\alpha$ -ZOL, des métabolites 5 & 8, ce qui s'est accompagné d'une augmentation de la génotoxicité de la ZEA. Ceci corrobore l'étude faite par Ayed *et al.* (2011) montrant que l' $\alpha$ -ZOL augmente le pourcentage des aberrations chromosomiques dans les cellules de moelle osseuse de souris et dans les cellules HeLa (dérivées de

carcinome du col utérin humain). Ce métabolite a aussi une activité œstrogénique supérieure à celle de la ZEA (Minervini *et al.*, 2005, Fitzpatrick *et al.*, 1989). Il est probable que certains des métabolites observés soient des dérivés sulfoconjugués.

L'exposition simultanée des cellules HK2 aux deux mycotoxines modifient clairement la génotoxicité de l'une par rapport à l'autre. Il est intéressant de noter que l'effet génotoxique de l'OTA prime sur celui de la ZEA et se résume à la formation uniquement du C-C8dG OTA. La formation de cet adduit est corrélée à l'expression de la COX2 et de la lipox (Pfohl-Leskowicz & Castegnaro, 2005 ; Manderville & Pfohl-Leskowicz, 2008). La régulation de ces enzymes est liée au récepteur AhR. La ZEA par sa propriété œstrogénique stimule le récepteur Ah ; et donc induit ces enzymes. Ces enzymes favorisent de ce fait la biotransformation de l'OTA en dérivé génotoxique.

Le DC-OTHQ n'est plus formé, par contre le métabolite 5 correspondant à la ZEA apparaît. Il est intéressant de noter que lorsque ce métabolite 5 apparaît, le DC-OTHQ n'est plus formé. Il est donc vraisemblable que ce métabolite 5 corresponde à la forme décarboxylée de la ZEA. Ces deux métabolites sont sans doute substrat de la même enzyme (décarboxylase) ; mais la ZEA aurait plus d'affinité. La disparition de ce métabolite 5 lors de la présence de GSH indique que la ZEA est conjuguée au GSH et ne peut plus être substrat de la décarboxylase. Ce métabolite ne disparaît pas en présence de sélénométhionine.

Le patrimoine génétique des cellules mammaires (MCF7) étant différent de celui des cellules rénales (HK2), la réponse est différente. L'exposition de ces cellules aux deux toxines conduit à un effet génotoxique. Cependant au niveau des MCF7, l'OTA conduit à la formation d'un seul adduit lié à la forme quinone. Les métabolites formés le sont en moins grande quantité que dans les cellules rénales et ne sont pas totalement identiques. Dans les MCF7, seule la forme OTHQ1 est formée, alors que les deux formes étaient formées dans les HK2. D'autre part, il y a formation de 4 [OH] OTA dans les MCF7 qui n'était formé dans les HK2 qu'après adjonction de GSH. Il est en fait formé lors de la réaction de déhalogénéation oxydative sous l'effet de la glutathion peroxydase. Dans ces cellules ni le GSH, ni la sélénométhionine ne modifie le profil métabolique, mais limite leur formation. Ceci se solde par une disparition des adduits. La ZEA est plus métabolisée dans les cellules MCF7 que dans les HK2, notamment avec la formation d'une grande quantité de  $\beta$ -Zol et d' $\alpha$ -Zol ; mais elle est moins génotoxique dans ces cellules. Le GSH et la sélénométhionine éliminent totalement les adduits de la ZEA bien qu'il n'y ait que peu de changement dans le profil métabolique, si ce n'est la disparition des métabolites 3, 8 & 9.

Le profil métabolique observé lorsque les cellules MCF7 sont exposées aux deux mycotoxines simultanément est identique à celui observé lorsque les cellules ne sont exposées qu'à l'OTA. Il n'y a plus de formation des métabolites de la ZEA à l'exception du métabolite 12. Le profil d'adduits est similaire à celui observé lorsque les cellules sont exposées à l'OTA seule. L'adjonction de GSH et de sélénométhionine élimine les adduits d'OTA et permettent la formation d'adduits spécifique de la ZEA. La disparition des adduits d'OTA peut s'expliquer par la diminution de la métabolisation de l'OTA.

## 2. Désactivation de l'OTA par les parois de levures et les levures enrichies en antioxydant

La plupart des études réalisées sur la désactivation des mycotoxines se basent uniquement sur des tests *in vitro* et notamment sur la capacité des produits à adsorber les mycotoxines et en faciliter leur élimination par les fèces. Les tests *in vitro* évalue la 'disparition' de la mycotoxine du milieu partant du postulat qu'une fois adsorbée, elle ne pourra pas être remobilisée ; et qu'il n'y a pas eu biotransformation en un métabolite. Ces résultats obtenus *in vitro* ne sont pas forcément transposables à l'échelle du vivant.

La meilleure manière permettant de valider l'efficacité d'un adsorbant est de réaliser une étude *in vivo*.



## 2.1 Etude de détoxification de l'OTA chez le poulet de chair par les parois de levures et les levures enrichies en antioxydant (glutathion et sélénométhionine).

Le but de cette étude était d'analyser l'effet *in vivo* de divers dérivés de levures ajoutés à l'aliment des poulets sur la génotoxicité de l'OTA au niveau rénal et hépatique. Cette étude est réalisée en étroite collaboration avec le laboratoire du Pr Johanna Fink-Gremmels, Université d'Utrecht, Faculté de Médecine Vétérinaire, labo de pharmacotoxicologie, Hollande.

Au cours de cette étude, l'OTA a été analysée dans le sang, la bile et dans les tissus (foie et rein). Les métabolites ont été recherchés aussi au niveau rénal et hépatique.

En parallèle, nous avons analysé les adduits à l'ADN des reins et des foies de poulet nourris avec des aliments contenant de l'OTA seule ou en présence des levures. Nos résultats ont été comparés à la substance adsorbante de référence, le charbon actif.

Le protocole est schématisé dans la figure 153. 80 poulets males (souche Ross308) ont été répartis aléatoirement en 8 groupes expérimentaux soit 10 poulets par groupe. Après une période d'adaptation de 11 j, les huit groupes ont ingéré pendant trois jours l'aliment supplémenté ou non avec les parois de levures/ou les levures enrichies en antioxydant à un taux d'incorporation de 500g/kg d'aliment. Ensuite ces mêmes animaux ont reçu pendant sept jours le même aliment mais contaminé en OTA (2,5 mg/kg d'aliment, ce qui équivaut à une exposition de 8µg/kg pc) et supplémenté ou non en parois de levures ou levures enrichies en antioxydant (500g/kg d'aliment) (voir tableau 62).

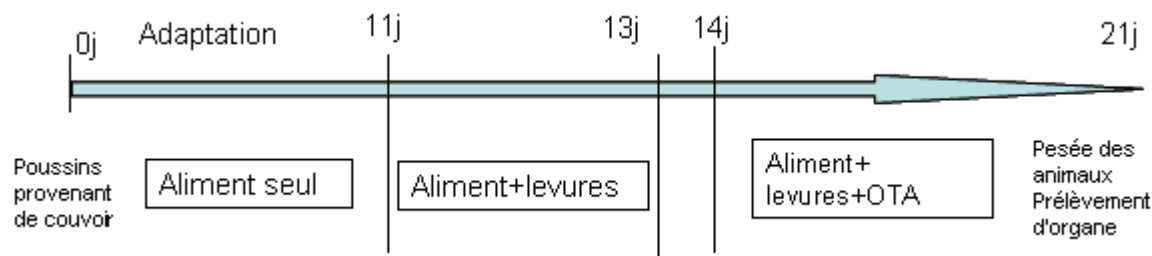


Figure 153 : Traitement des animaux

Les concentrations d'OTA dans le sang et la bile ont été mesurées par l'équipe hollandaise. Pour l'analyse des organes (foie et rein) à partir de chaque groupe nous avons constitué trois sous-groupes (lot A, B, C) (= pool de trois échantillons de chaque sous-groupe sur lequel nous avons réalisé l'extraction).

Tableau 62 : Groupe d'animaux testés

Groupe	Type de levure testée	Suppléments ajoutés à la nourriture
1		Témoin – Aucun supplément
2		OTA
3	Levure morte	(levure enrichie GSH) + OTA
6	Levure morte	(levure enrichie SeMet) + OTA
10	Paroi de levure boulangère	YCW-PCS + OTA
11	Paroi de levure brassicole	YCW-PRO2 + OTA
12	Levure vivante	(levure vivante) + OTA
13		Charbon actif +OTA

## 2.2 Concentration d'OTA dans le sang, bile et tissus des poulets

### 2.2.1 Concentration d'OTA dans le sang et la bile des poulets (analyses faites par J Fink-Gremmels)

Il a été constaté que dans le groupe des animaux 'témoin' c'est-à-dire ceux ne recevant pas d'OTA surajouté dans l'aliment, on retrouve une petite quantité d'OTA dans le plasma, la bile et les tissus. Ceci provient du fait qu'il est très difficile de trouver une alimentation animale complètement exempte de mycotoxines. Les concentrations en OTA dans le sang et la bile sont répertoriées dans la figure 154.

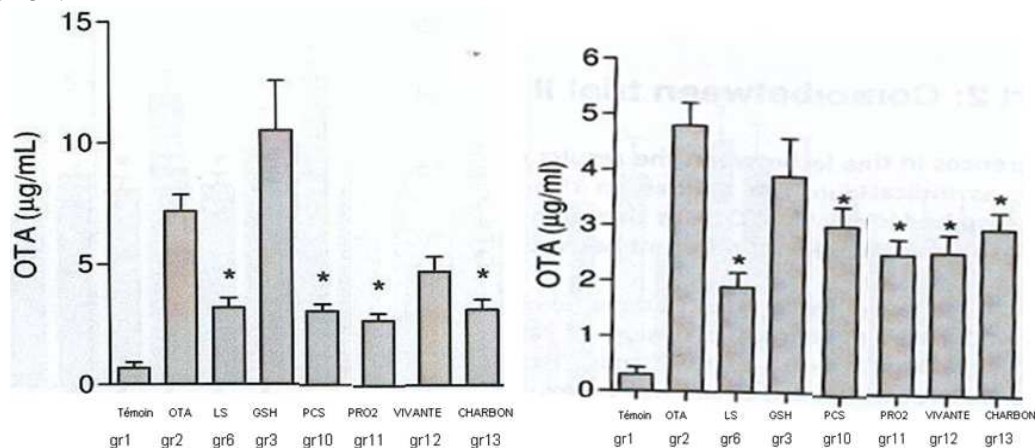


Figure 154 : Concentration d'OTA plasmatique (à gauche) ; concentration d'OTA dans la bile (à droite).

Une diminution significative du taux d'OTA dans le plasma, la bile des animaux des groupes 6 (levure sélénée), 10 (parois de levure boulangère), 11 (parois de levure brassicole), 12 (levure vivante) et 13 (charbon) par rapport au groupe 2 (OTA seule) est observée. Le taux plasmatique d'OTA chez les animaux des groupes 6 ; 10 ; 11 et 13 est identique entre chaque groupe. Pour les animaux du groupe 12 ayant reçu la levure vivante, bien que le taux plasmatique soit significativement plus faible que pour les animaux du groupe 2, ce taux est plus élevé que pour les autres groupes. Les concentrations au niveau biliaire sont similaires entre les groupes 10 ; 11 ; 12 ; 13. C'est pour le groupe six (levure SeMet) que le taux biliaire est le plus faible.

Par contre, dans le groupe trois (levure GSH) il y a plus d'OTA dans le plasma que pour le groupe deux bien que l'élimination biliaire soit quasiment équivalente à celle du groupe deux. Le fait qu'il n'y ait pas une corrélation entre les concentrations plasmatiques et biliaires peut s'expliquer partiellement par le fait que l'OTA a été analysée dans les deux fluides avec des techniques différentes. Le dosage de l'OTA plasmatique a été réalisé directement à l'aide de kits ELISA, ceci permet de doser seulement l'OTA libre. L'OTA dans la bile a été mesurée par HPLC après extraction et traitement à la glucuronidase, permettant de doser l'OTA libre ainsi que l'OTA qui était fixée à l'acide glucuronique. Par ces deux techniques, il risque malgré tout d'avoir une sous estimation du taux réel d'OTA puisque 90% de l'OTA se fixe aux protéines plasmatiques (Hagelberg *et al.*, 1989) et une partie de l'OTA est éliminée sous forme de dérivés GSH.

### 2.2.2 Concentration d'OTA dans les tissus des poulets

L'analyse de l'OTA dans les tissus a été réalisée suite à une extraction en milieu acide, qui permet non seulement de défixer l'OTA liée aux protéines mais permet aussi l'extraction des métabolites d'OTA.

Le taux d'OTA dans le foie diminue significativement pour les groupes 6 (levure sélénée), 10 (parois de levure boulangère), 11 (parois de levure brassicole), 12 (levure vivante) et 13 (charbon) (figure 155 et tableau 63)

Dans les reins des animaux ayant reçu un aliment contaminé en OTA et divers produits à base de levures une baisse significative du taux d'OTA est observée dans les groupes 6 (Levure sélénée), 11 (parois de levure brassicole), 12 (levure vivante) et 13 (charbon activé).

Le taux d'OTA dans les reins des animaux appartenant au groupe trois (levure GSH) est légèrement plus élevé que dans le groupe deux (OTA seule). La différence n'est pas significative à cause de la grande variabilité notée dans le groupe deux (OTA seule). Néanmoins lorsqu'on compare la différence entre le groupe 10 (parois de levure boulangère) pour lequel la quantité d'OTA est similaire à celle observée dans le groupe 2 ; et le groupe 3 (GSH) on constate que l'augmentation dans le cas du groupe 3 est significative.

Tableau 63 : Concentration d'OTA dans les foies et les reins des poulets

Groupes/concentration d'OTA	moyenne [OTA] en µg /kg foie	Moyenne [OTA] en µg/kg rein
groupe 1 -Control	5,7 ± 4,5	4,4 ± 2,7
groupe 2 -OTA	35,1 ± 8,3	22,2 ± 5,8
groupe 3- levure GSH	30,4 ± 9,8	24,2 ± 1,2
groupe 6- levure LS	17,5 ± 1,4	17 ± 1,5
Groupe 10-levure boulangère PCS	15,4 ± 4,5	19,6 ± 2,7
Groupe 11- levure de bière PRO2	13,72± 2,4	16,7± 1,2
groupe 12 -levure vivante	20,9± 4,3	17,7 ± 3,9
groupe 13 -charbon actif	14,1 ± 2,7	13,8 ± 1,3

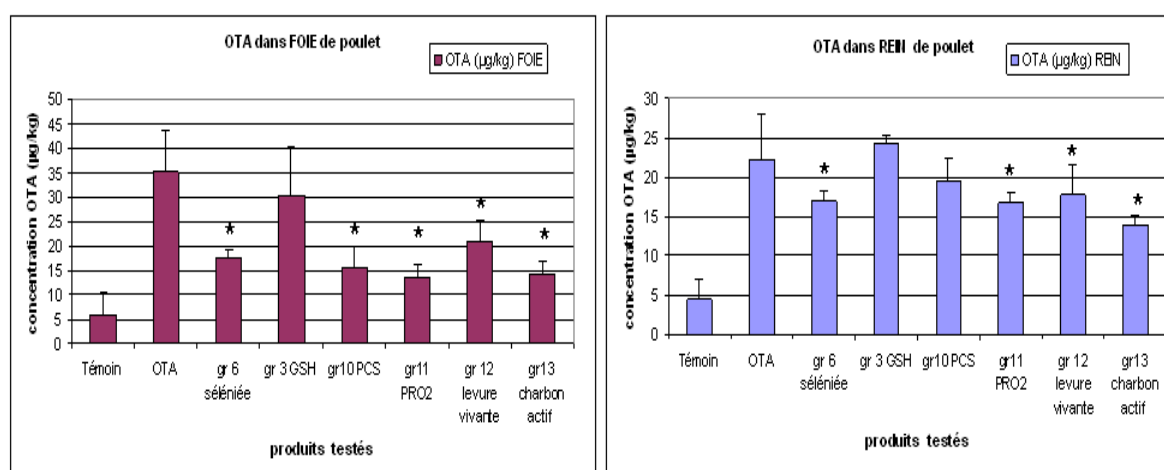


Figure 155 : Concentration d'OTA dans le foie (à gauche) ; concentration d'OTA dans le rein (à droite).

Les concentrations d'OTA sont équivalentes dans le foie et dans le rein des groupes 6 (Levure sélénée) et 13 (charbon actif), alors que dans le groupe 2 (OTA seul) ; le groupe 3 (levure GSH) et le groupe 12 (levure vivante), la concentration en OTA dans le foie est plus importante que dans le rein (figure 156). Ceci peut s'expliquer par une réabsorption et recirculation des dérivés conjugués au glutathion du rein vers le foie. D'autre part les dérivés glutathion peuvent être éliminés par la bile puis à partir de l'intestin qu'il y ait action ou non de la microflore de l'intestin, les dérivés d'OTA peuvent être réabsorbés (Inoue *et al.*, 1982 ; 1984).

A l'inverse dans les groupes 10 (parois de levure boulangère) et 11 (parois de levure Brassicole), le taux d'OTA est plus élevé dans le rein que dans le foie (figure 156).

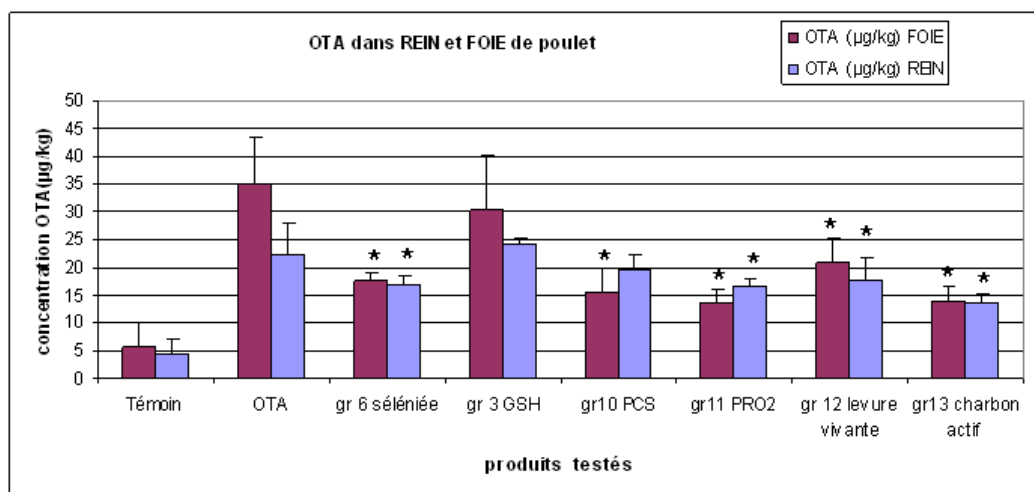


Figure 156 : Comparaison du taux d'OTA dans le rein et le foie des poulets.\* significativement différent du groupe 2 (OTA seul).

Les dérivés conjugués au glutathion sont pris en charge par les transporteurs des anions organiques (Inoue *et al.*, 1984), inhibé par le probénécide. L'OTA emprunte les mêmes transporteurs, il peut donc y avoir une compétition entre les dérivés conjugués au glutathion et l'OTA elle-même. Il a été montré qu'une partie de l'OTA qui se retrouve dans la bile peut être réabsorbée au niveau de l'intestin et suit le cycle entéro-hépatique (Fuchs *et al.*, 1988) (figure 157).

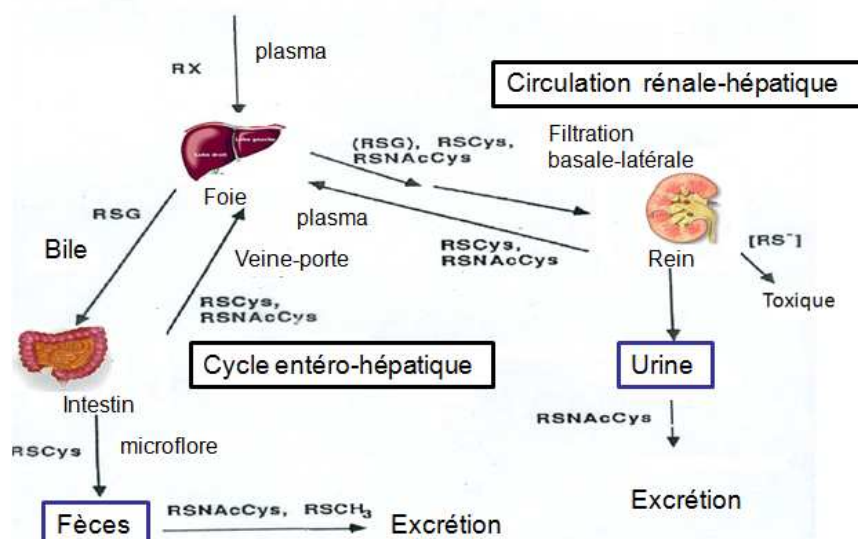


Figure 157 : Schéma circulation réno-hépatique et entérohépatique des dérivés glutathions conjugués

Le charbon actif sensé adsorbé totalement l'OTA n'est finalement pas aussi efficace que prévu. D'après l'étude d'adsorption *in vitro* réalisé dans notre laboratoire (Joannis-Cassan *et al.*, 2011) (annexe 4), la levure enrichie en glutathion (groupe 3) présentait la meilleure capacité d'adsorption. Dans la figure 158 ci-dessous, nous rappelons les résultats d'adsorption correspondant au *ratio* utilisé dans l'alimentation des poulets. L'adsorption a été mesurée en quantifiant la disparition de l'OTA dans le surnageant, impliquant soit sa fixation aux levures, soit à sa métabolisation en utilisant la technique de screening mis au point dans notre laboratoire (Faucet-Marquis *et al.*, 2012, soumis).

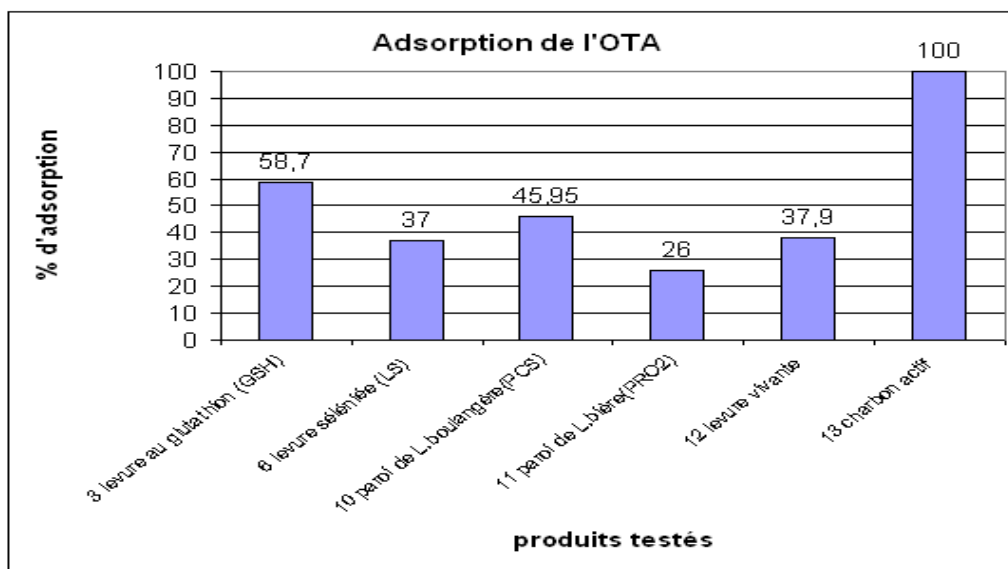


Figure 158 : Le % d'adsorption de l'OTA (par rapport au témoin) par les parois de levures et les levures enrichies en antioxydants

La meilleure adsorption est observée avec la levure GSH (environ 60%). La levure sélénée et la levure vivante fixent l'OTA de manière équivalente (environ 37%). La paroi de levure boulangère est plus efficace pour fixer l'OTA que l'écorce de levure brassicole (figure 158).

On s'attendait donc à avoir une diminution significative du taux d'OTA aussi bien dans le sang, la bile que les organes des groupes trois (L GSH) et 13 (Charbon). En prenant en compte tous les paramètres (plasma, bile et les tissus), les concentrations d'OTA les plus faibles ont été observées suite à l'ingestion de levure SeMet (groupe 6) et du charbon actif (groupe 13). La concentration la plus élevée est observée suite à l'ingestion de levure enrichie en glutathion (groupe 3). Aucune corrélation ne peut être établie entre la diminution du taux d'OTA dans le sang, la bile et les organes avec l'adsorption ni avec le taux de glucanes et mannanes dont les taux sont indiqués dans le tableau 64.

Tableau 64 : Taux des mannanes et glucanes dans les produits de levures testés

groupe	Type de levure testée	Mannanes (en g/100g de levure)	Glucanes (en g/100g de levure)	Mannane/Glucane
3	levure enrichie GSH	8,7	13,1	0,89
6	levure enrichie SeMet	11,6	13,1	0,66
10	Paroi YCW-PCS (boulangère)	21,3	23,7	0,90
11	Paroi YCW-PRO2 (de bière)	20	28,8	0,69
12	levure vivante	11,9	32,5	0,37
13	Charbon actif	-	-	-

## 2.3 Evaluation de la génotoxicité (formation d'adduits à l'ADN)

Nous avons recherché les adduits de l'OTA dans les organes (foies et reins) de poulet traités avec l'OTA et/ou les produits à base de levures.

Nous avons comparé les groupes traités par les produits à base de levures avec le groupe deux ayant reçu l'OTA seule. Les profils d'adduits sont schématisés dans les figures ci-dessous.

### 2.3.1 Comparaison du profil d'adduits rénaux et hépatiques des animaux contrôles et des animaux contaminés en OTA seule

Dans le groupe contrôle (sans OTA), aucun adduit n'a été trouvé dans les reins. Dans les foies de ce même groupe, deux adduits ont été observé (5; 7) (figure 159).

Dans le groupe (2) traité avec l'OTA, cinq adduits [1, 5, 7, 6, X] sont détectés au niveau du rein, dont les deux adduits (5 et 7) retrouvés précédemment dans le foie du groupe 1.

Quatre adduits (1, 5, 6, 7) sont retrouvés simultanément dans le rein et dans le foie alors que quatre autres adduits sont spécifiques du rein (2, 3, 4, 8, 9). L'adduit 4 correspond à l'adduit C-C8dG OTA.

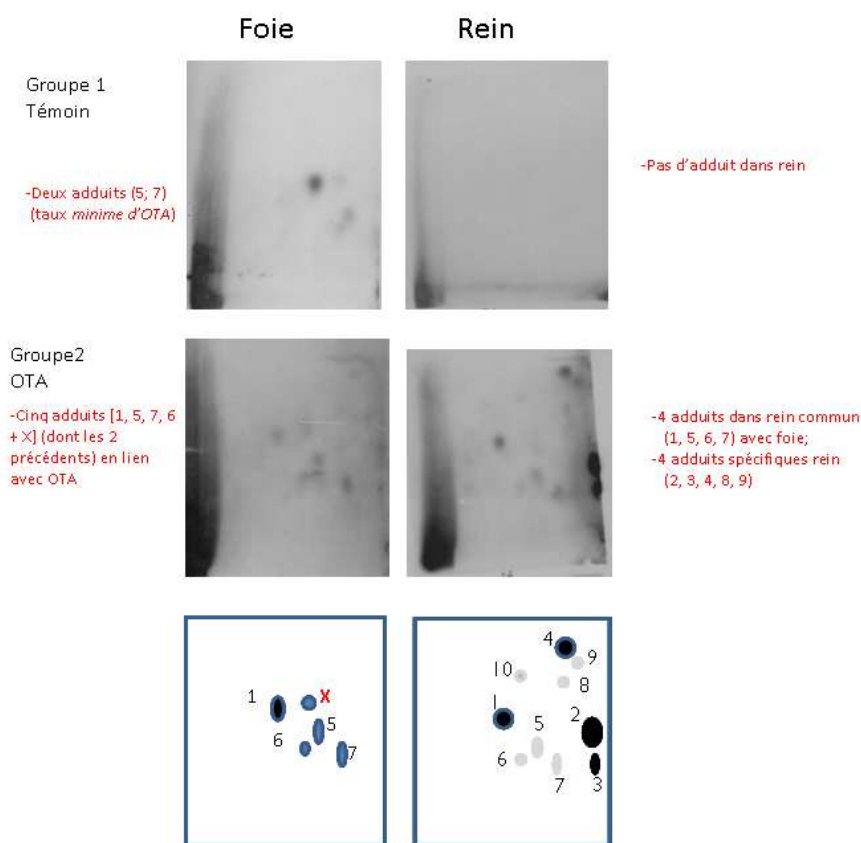


Figure 159 : Profils d'adduits à l'ADN hépatique et rénal des animaux contrôles (sans OTA) et des animaux du groupe 2 (exposés à l'OTA seule).

### 2.3.2 Comparaison du profil d'adduits rénaux et hépatiques des animaux du groupe 12 (levure vivante) et du groupe 13 (charbon actif)

Dans le groupe 12 (levure vivante) et 13 (charbon actif), aucun adduit n'a été trouvé dans le foie des animaux (figure 160).

Au niveau des reins des animaux du groupe 12 (levure vivante), les adduits 5, 6, 7 et 3 disparaissent, les adduits 1 et 2 diminuent significativement, par contre les adduits 4 et 9 sont amplifiés. De nouveaux adduits a, b, c et 10 apparaissent.

Dans les reins du groupe 13 (charbon), il a été noté une diminution de l'adduit 4 et disparition des adduits 2, 3, 5, 6, 7, 8 et 9. L'adduit 1 est amplifié et l'adduit X apparaît.

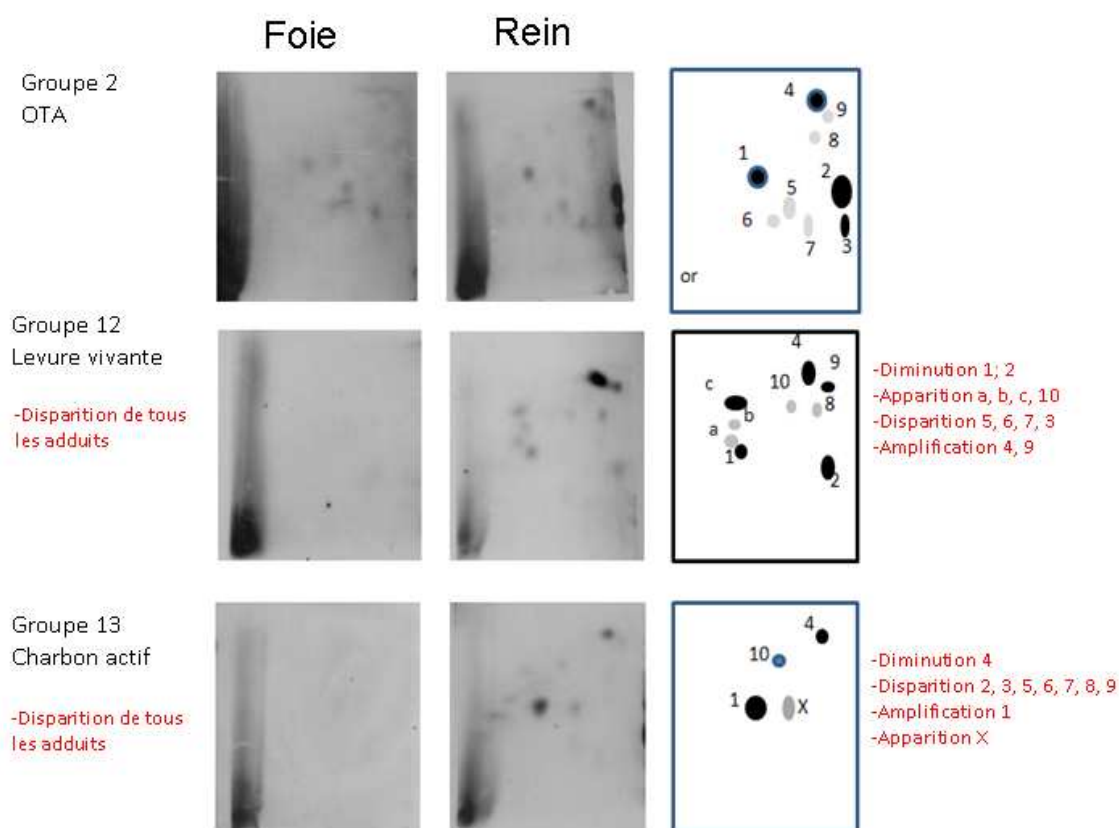


Figure 160 : Profils d'adduits à l'ADN hépatique et rénale des animaux des groupes 13 (charbon actif) et 12 (levure vivante)



### 2.3.3 Comparaison du profil d'adduits rénaux et hépatiques du groupe 10 (paroi de levure boulangère) et 11 (paroi de levure brassicole)

En comparant l'effet des deux parois de levure, nous avons constaté que les parois de levure boulangère (gr 10) ont permis la suppression de tous les adduits dans le foie. Dans le foie des animaux du groupe 11 (levure brassicole), l'adduit 1 et X persiste (figure 161).

Au niveau du rein, il y a une nette amélioration avec disparition de presque tous les adduits avec les deux types d'écorce de levures à l'exception des adduits 1 & 4 qui persistent et s'amplifient. Avec l'écorce de levure boulangère l'adduit 8 également s'amplifie.

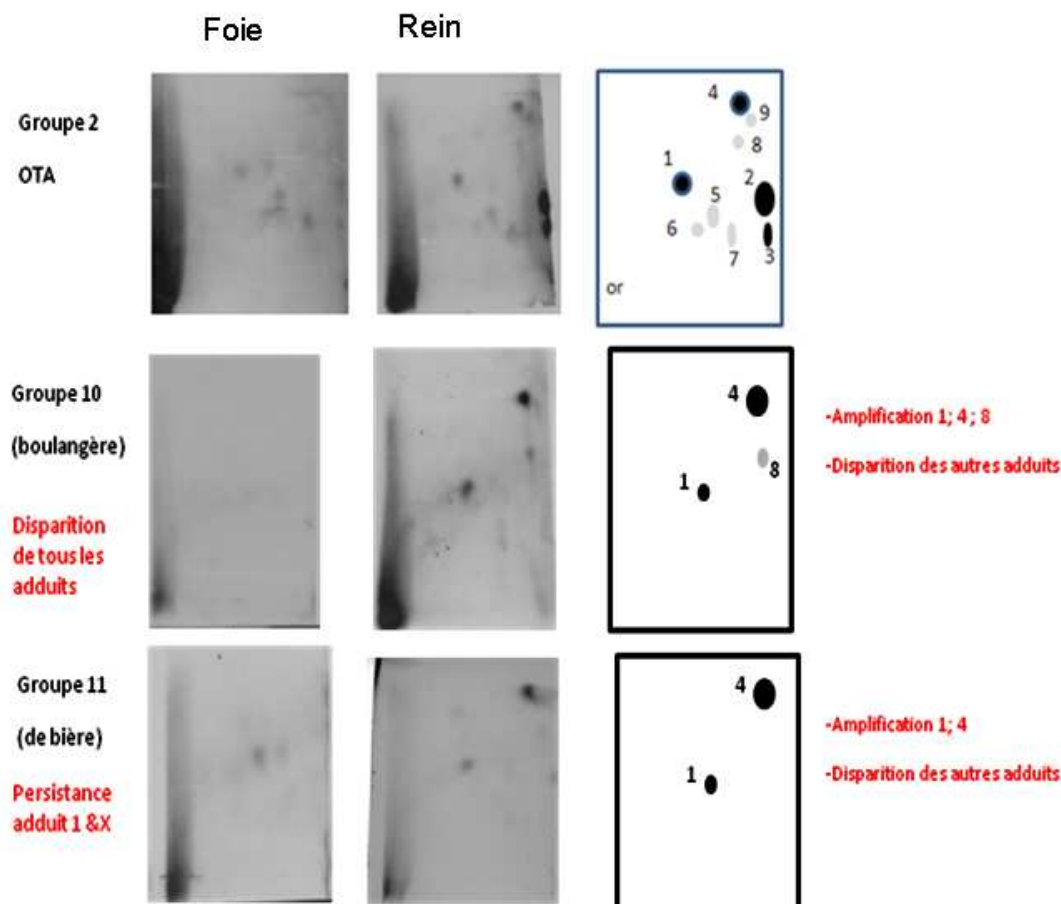


Figure 161 : Profils d'adduits à l'ADN hépatique et rénale des animaux exposés à l'OTA en présence de paroi de levure boulangère (gr10) ou de paroi de levure brassicole (gr 11).



### 2.3.4 Comparaison du profil d'adduits rénaux et hépatiques des animaux du groupe 3 (levure glutathion) et du groupe 6 (levure sélénée)

La levure enrichie en glutathion (gr3) modifie le profil d'adduits à l'OTA dans le foie comme dans le rein. On note l'augmentation des adduits 5 & 7, la diminution des adduits 1 & 6 et l'apparition des adduits 2, 8 dans les foies des poulets. Au niveau rénal, les adduits 2, 3, 5, 6, 7 ont disparus, l'intensité de l'adduit 1 a diminué, l'adduit 4 a augmenté et les adduits X, a, b ont apparu (figure 162).

La levure sélénée (gr 6) a un effet positif sur le foie des poulets dans la mesure où moins d'adduits aussi bien quantitativement que qualitativement sont observés. Seuls les adduits 1, 5, 6, 7 persistent avec une intensité moins importante que dans le groupe OTA seul. Toutefois, cette même levure (gr6) modifie le profil au niveau des reins et aggrave la génotoxicité de l'OTA. L'adduit 2 disparaît et l'adduit 3 diminue par contre les adduits 1,4, 5,7 sont amplifiés et de nouveaux adduits X, Y, Z apparaissent.

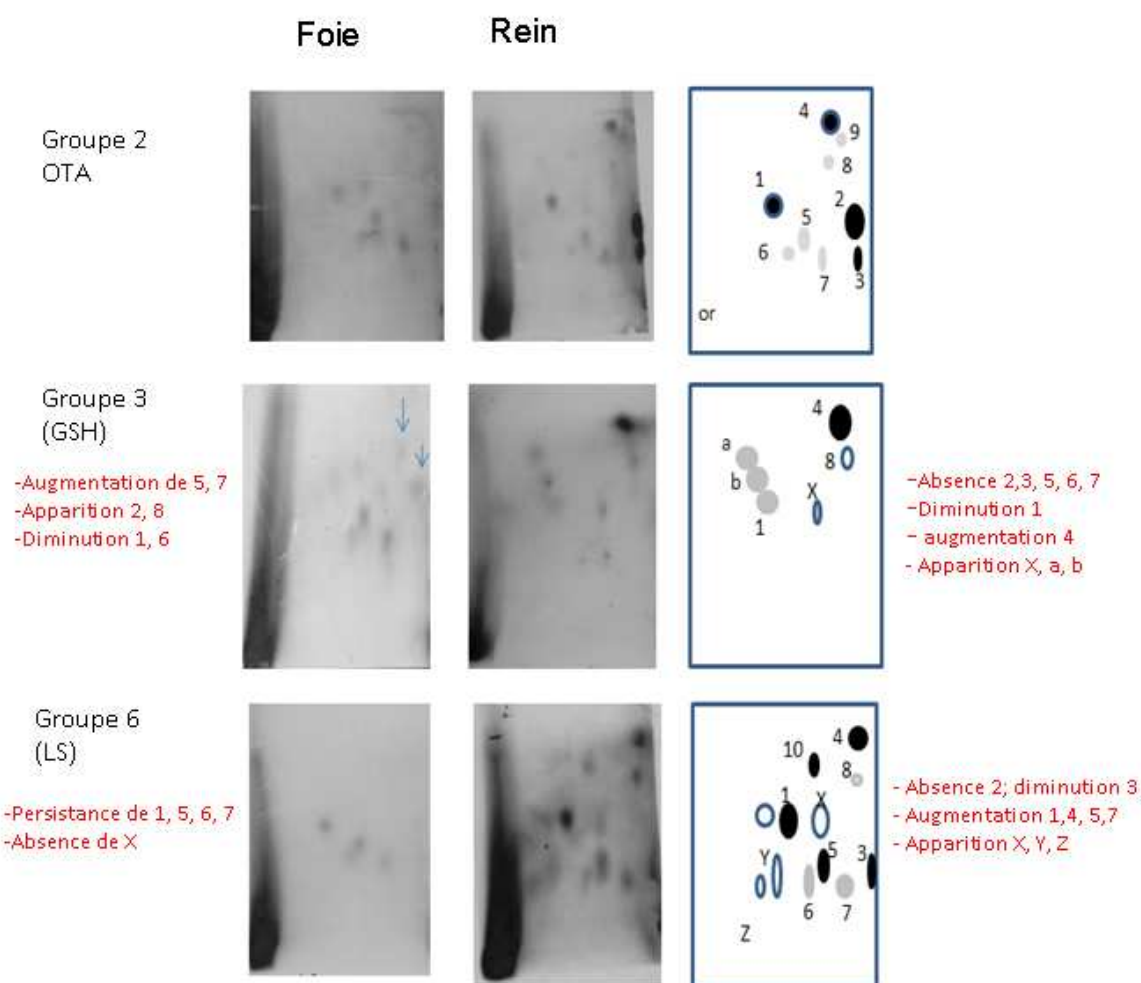


Figure 162 : Profils d'adduits à l'ADN hépatique et rénale des animaux exposés à l'OTA en présence de levure enrichie glutathion (gr 3) ou levure sélénée (gr 6)

## 2.4 Analyse des métabolites d'OTA formés au niveau du rein et du foie/comparaison aux adduits

La différence dans les effets génotoxiques observés (analyse des adduits) nous ont amené à comparer les profils métaboliques au niveau du foie et du rein des animaux.

### 2.4.1 Profil des métabolites dans les reins et foies des animaux du groupe 2 (témoin positif)

La figure 163 compare les différents métabolites observés dans le foie et les reins et des animaux du groupe 2 traités avec l'OTA seule.

Plusieurs métabolites connus sont détectés dans le foie notamment : l'OT $\alpha$  et l'OT $\beta$ , (formes hydrolysées de l'OTA et de l'OTB), l'OTB (OTA déchloré), l'OTHQ (dérivé quinone de l'OTA), l'OTHQ-GSH (OTA-quinone conjugué à un glutathion), et le DC-OTHQ (forme décarboxylé), l'OP-OTA, (forme ouverte de l'OTA), et l'OTC (forme méthylée). Six métabolites inconnus dénommés A, B, D, E, F, G.

Dans le rein, le profil métabolique est qualitativement différent. La plupart des métabolites communs (OTHQ-GSH, OP-OTA, OTC) diminuent quantitativement. Le métabolite D et le DC-OTHQ sont plus important dans le rein. Certains métabolites disparaissent : l'OT $\alpha$  ; l'OTHQ ; l'OTB ; les métabolites A ; B, E ; F ; G. Par contre deux métabolites ne sont observés que dans le rein : l'OTB-GSH ; l'OTHQ-NAC.

En général les métabolites sont formés dans le foie puis sont éliminés soit par la voie biliaire, soit acheminés vers le rein en vue de leur élimination rénale. Les métabolites absents du rein sont vraisemblablement éliminés par voie biliaire. On peut supposer que les métabolites ne se retrouvant qu'au niveau du rein ont été formés au niveau de cet organe, riche en peroxydases. La présence du dérivé OTHQ-NAC s'explique par le fait qu'au niveau du rein le dérivé glutathion correspondant (OTHQ-GSH) subit une métabolisation supplémentaire faisant intervenir la gamma glutamyltranspeptidase conduisant à la formation du dérivé N-acétyl cystéine, qui peut être réabsorbé au niveau rénal (Inoue *et al.*, 1984 ; Hinchman & Ballatori, 1984). La formation du dérivé OTB-GSH exclusivement au niveau rénal s'explique par le fait que le rein est riche en glutathion peroxydase, enzyme connu pour provoquer une déchloration par substitution du chlore par le GSH. Nous avons montré que sous l'effet d'une peroxydation il y avait formation d'OTB-GSH. Les mêmes conditions conduisent à la formation de C-C8dG OTA (Hadjeba-Medjdoub *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter qu'en effet le taux de C-C8dG augmente en parallèle à la formation d'OTB-GSH dans le rein.

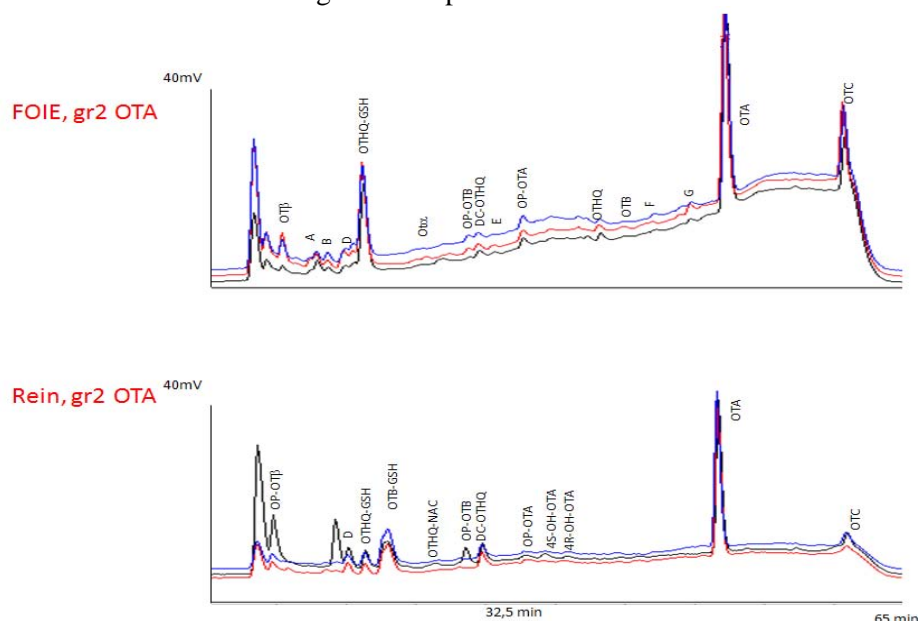


Figure 163 : Profil métabolique rénal et hépatique du groupe 2 (animaux exposés à l'OTA)

## 2.4.2 Profil des métabolites dans les foies des animaux nourris avec OTA en présence de levure vivante (groupe 12) ou de charbon actif (groupe 13)

Nous avons comparé le profil des métabolites au niveau du foie des animaux ayant ingéré de l'OTA seul à ceux des animaux ayant eu en plus dans leur ration du charbon actif (gr 13) ou de la levure vivante (gr 12) (figure 164).

Bien que l'adsorption théorique avec le charbon soit équivalente à 100%, nous confirmons que tout l'OTA n'a pas été adsorbé puisque nous retrouvons de l'OTA et des métabolites dans le foie. Il y a disparition de nombreux métabolites : OT $\beta$ ; DC-OTHQ ; OTHQ ; et le métabolite G. Par contre le métabolite D ; l'OP-OTB ; OP-OTA sont considérablement amplifiés de même que le 4-R-OH-OTA et l'OT $\alpha$ . En ce concerne l'impact de la levure vivante, il est clair que sa présence dans la ration modifie la métabolisation de l'OTA. Il y a augmentation de plusieurs métabolites : OP-OT $\beta$ ; DC-OTHQ ; OP-OTA ; G. Quatre métabolites apparaissent : OT $\alpha$  ; OTHQ-NAC ; OTB et les métabolites E ; K ; I. Cette modification du profil s'explique par la métabolisation de l'OTA par la levure. Cette métabolisation peut avoir lieu au niveau du tube digestif. L'absorption des métabolites ne s'effectue pas nécessairement de la même manière que celle de l'OTA.

Certains dérivés connus pour leurs propriétés génotoxiques comme l'OTHQ disparaissent. Dans les foies de ces 2 groupes, aucun adduit n'a été détecté.

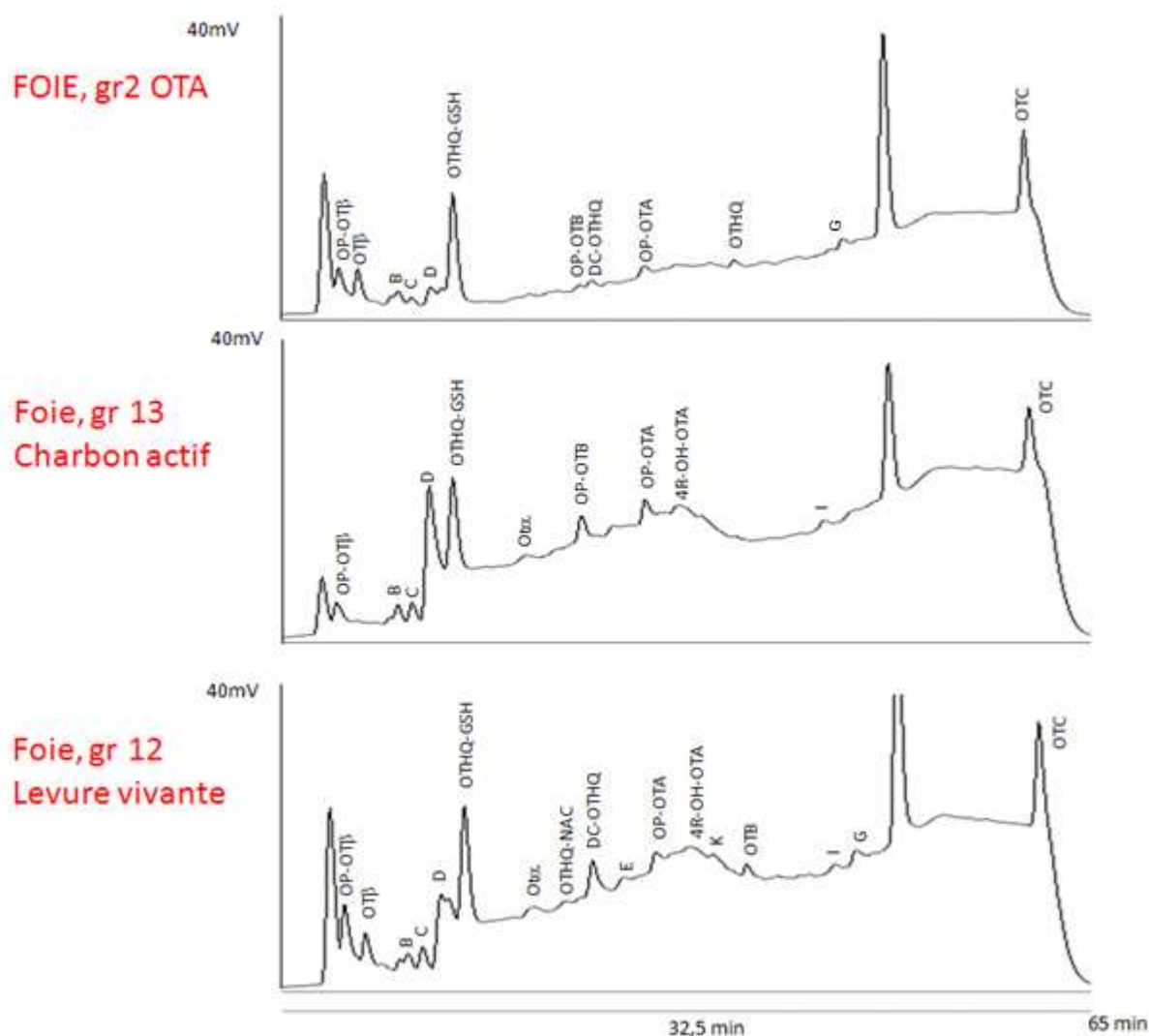


Figure 164 : Profil métabolique hépatique des groupes 13 (charbon actif) et 12 (levure vivante)

### 2.4.3 Profil des métabolites dans les foies des animaux nourris avec OTA en présence de parois de levure boulangère (groupe 10) ou de parois de levure brassicole (groupe 11)

Nous constatons que les deux parois de levures n'influent pas de la même manière sur les métabolites retrouvés au niveau du foie des animaux (figure 165). D'une manière générale, contrairement à ce qu'on aurait pu attendre, on note une amplification de certains métabolites. Ainsi avec la paroi de levure boulangère (gr 10) le métabolite D ; l'OP-OTB et l'OP-OTA sont formés en plus grande quantité. L'OTHQ-NAC et l'OT $\alpha$  apparaissent. L'OT $\beta$  et l'OTHQ disparaissent. L'OTC diminue. Cette modification du profil se solde par une disparition totale des adduits à l'ADN.

Avec les parois de levure brassicole (gr 11), la formation des métabolites C ; D ; OP-OTA, DC-OTHQ ; OTC augmente considérablement. Les métabolites A ; 4-OH-OTA ; K ; F apparaissent. Il est intéressant de noter que parmi deux adduits persistant dans le foie des animaux du gr 11, l'un d'eux correspondant à un adduit généré par l'OTHQ.

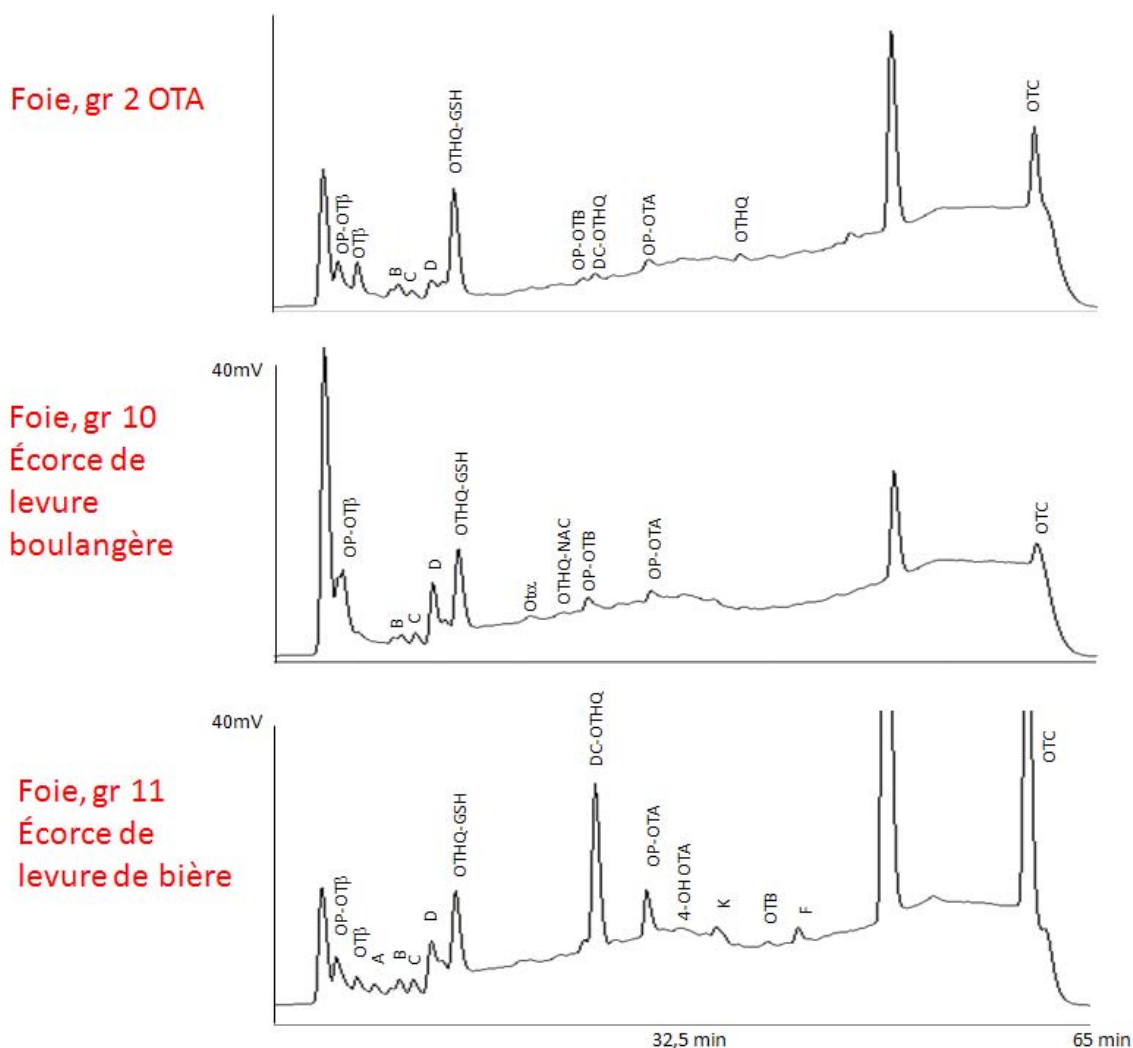


Figure 165 : Profil métabolique hépatique des groupes 10 (levure boulangère) et 11 (levure de bière)

#### 2.4.4 Profil des métabolites dans les foies des animaux nourris avec OTA en présence de levures enrichies au GSH (groupe 3) ou enrichies en sélénométhionine (groupe 6)

Les métabolites au niveau hépatique est différent aussi entre les deux groupes d'animaux ayant reçu dans leur ration des levures enrichies en glutathion (groupe 3) et en sélénométhionine (groupe 6) (figure 166).

Dans les foies des animaux traités avec la levure enrichie en glutathion (gr 3), par rapport au groupe 2 (OTA seul) on constate l'augmentation des métabolites B ; C ; OTHQ-GSH ; OP-OTB ; OP-OTA ; OTHQ. Trois métabolites apparaissent : l'OTHQ-NAC ; le 4[S] OH-OTA et le 4[R] OH-OTA.

Avec la levure sélénée (groupe 6), nous avons observé l'augmentation des pics de DC-OTHQ, OTHQ-GSH; le métabolite D; le métabolite B ; l'OP-OTA. Quatre métabolites apparaissent les métabolites A ; l'OT $\alpha$  ; l'OTHQ-NAC et le 4[S] OH-OTA.

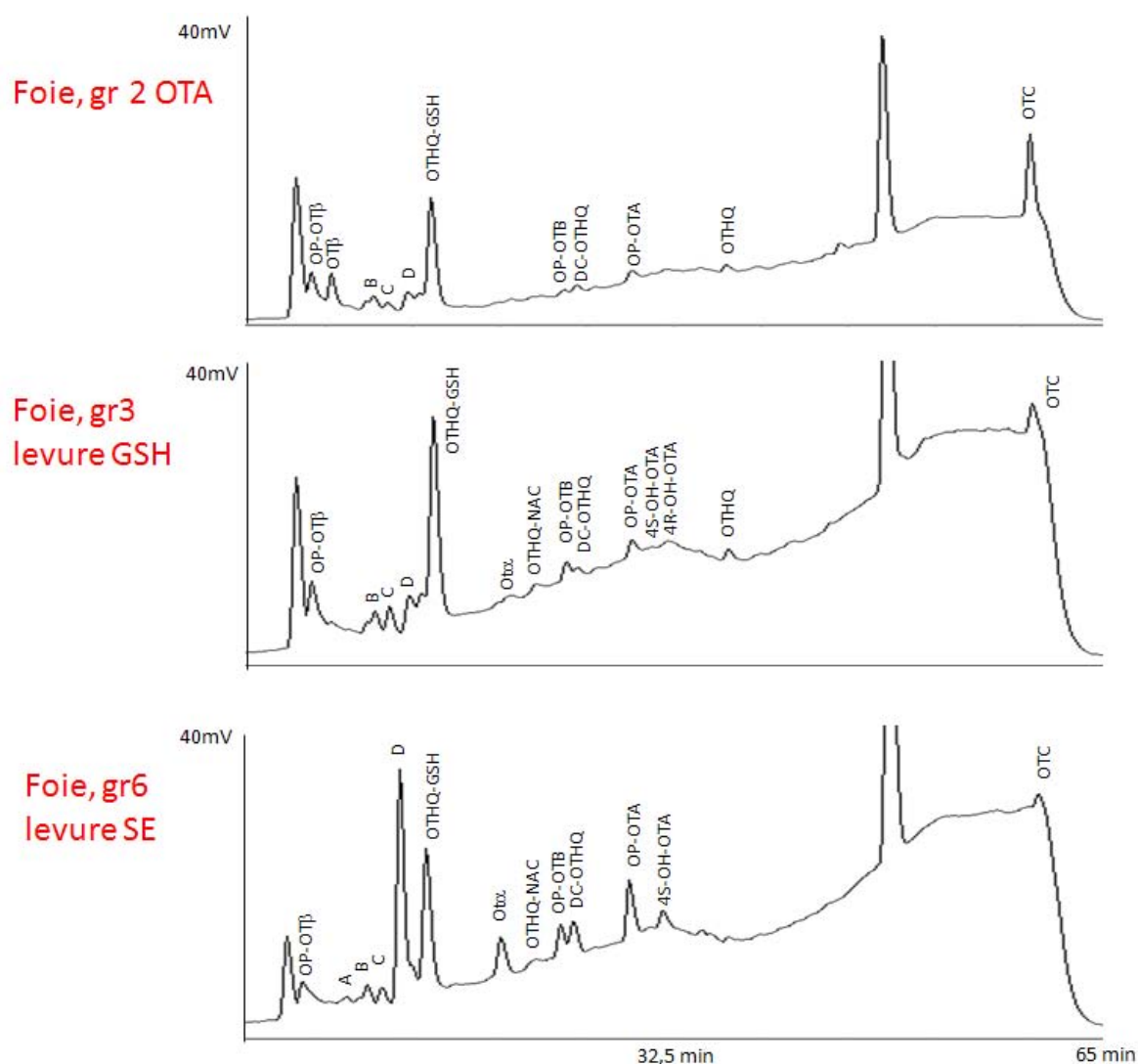


Figure 166 : Profil métabolique hépatique des groupes 3 (levure GSH) et 6 (levure SE)

### 2.4.5 Profil des métabolites dans les reins des animaux nourris avec OTA en présence de levure vivante (groupe 12) ou de charbon actif (groupe 13)

La métabolisation de l'OTA au niveau rénal est différente entre le charbon actif et la levure vivante (figure 167). L'adjonction de charbon activé dans la ration alimentaire des poulets (gr 13) se solde par une modification du profil des métabolites d'OTA au niveau rénale. Les métabolites OTB-GSH ; DC-OTHQ et OTC disparaissent. Par contre, la formation des métabolites D et l'OTHQ-GSH augmente. On note l'apparition du métabolite C ; de l'OT $\alpha$  ; l'OP-OTB ; de l'OP-OTA ; le 4[S] OH-OTA et du métabolite X. Il n'y a que peu de différence entre les métabolites observés dans le rein et dans le foie des animaux du groupe 13. Cela laisse à penser que les métabolites ont peut être été formé au niveau de l'intestin et qu'ils n'ont pas été adsorbés par le charbon.

Suite à l'adjonction de levure vivante dans la ration (gr 12) on note une modification du profil métabolique de l'OTA. Il y a plus de métabolites que dans les deux autres groupes. Comme pour le groupe 13 les métabolites OTB-GSH ; et l'OTC disparaissent alors que les métabolites A ; C ; l'OT $\alpha$  ; le 4[S] OH-OTA : les métabolites ; X ; H ; Y apparaissent. La formation du métabolite D ; de l'OTHQ-GSH ; du DC-OTHQ ; de l'OP-OTA augmente significativement. L'OTHQ est formée en grande quantité. Il y a qualitativement moins de métabolites dans le rein que dans le foie de ces animaux. L'OTHQ-NAC ; les métabolites E ; K ; I ; G disparaissent dans le rein. Alors que dans le rein il y a formation d'une grande quantité d'OTHQ, il y formation d'OTB dans le foie. De même dans le rein il y a formation de la 4 [S] OH OTA alors que dans le foie il y a formation de 4 [R] OH OTA. Ces entités peuvent être formées lors de réaction de déchloration oxydative *via* le glutathion. Ceci pouvant conduire aux quatre métabolites. Les métabolites X, H, Y ne sont formés que dans le rein.

La modification du profil de métabolites au niveau rénal explique la modification du profil d'adduits dans le rein des poulets. Pour les deux groupes 12 & 13, le nombre d'adduits individuels diminuent. Certains adduits persistent voire s'amplifie comme l'adduit 4 correspondant au C-C8dG OTA et peut être mis en parallèle avec la disparition de l'OTB-GSH et l'augmentation du métabolite D.

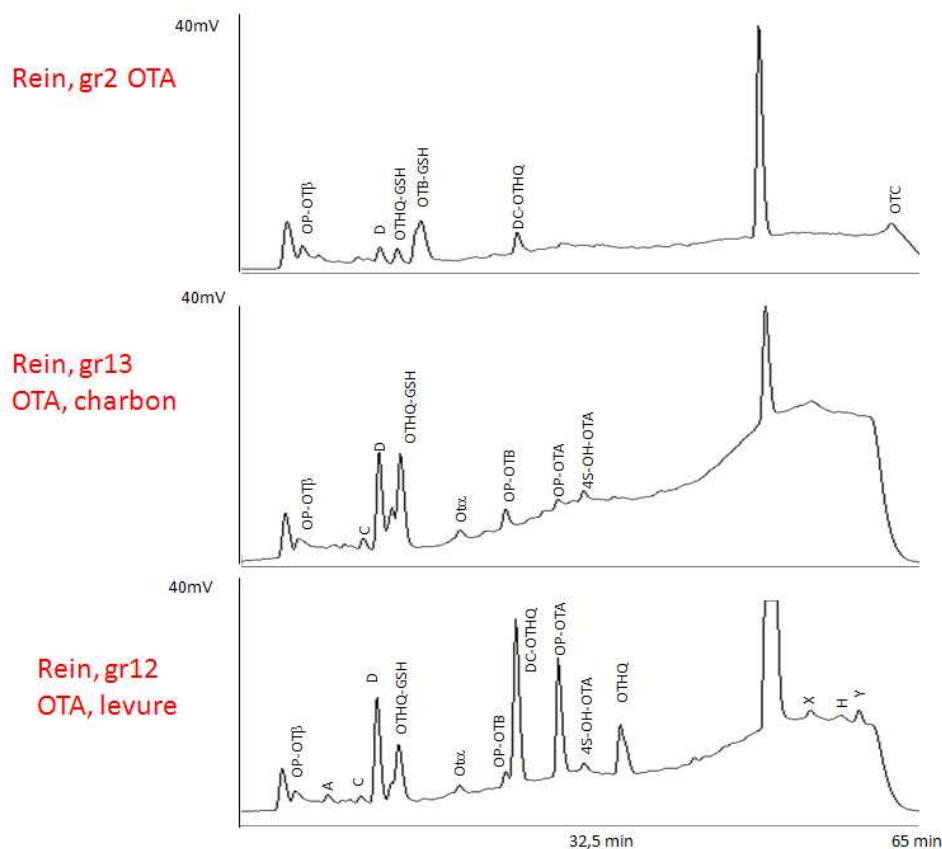


Figure 167 : Profil métabolique rénale des groupes 13 (charbon actif) et 12 (levure vivante)



## 2.4.6 Profil des métabolites dans les reins des animaux nourris avec OTA en présence de parois de levure boulangère (groupe 10) ou de parois de levure brassicole (groupe 11)

Dans la figure 168, nous avons comparé les métabolites dans les reins des animaux traités avec les deux parois de levures (gr 10, paroi de levure boulangère et gr 11, paroi de levure brassicole) à ceux des animaux ayant ingéré l'OTA seul (gr 2).

Les métabolites observés dans les reins des animaux ayant ingérés les rations contenant les deux parois de levure (10 et 11) sont identiques. Dans les deux groupes on observe la disparition des métabolites suivants : DC-OTHQ ; OTC. Il y a aussi diminution importante de l'OTB-GSH alors qu'au contraire il y a amplification de l'OTHQ-GSH et du métabolite D. L'OT $\alpha$  ; l'OP OTB ; l'OP OTA ; la 4-S-OH-OTA et la 4-R-OH-OTA apparaissent.

Le profil de métabolites au niveau du rein des animaux du gr 10 est très différent du point de vue quantitatif de celui du foie des mêmes animaux. On constate une nette augmentation dans les reins; de l'OT $\alpha$  ; de l'OP OTB et du métabolite D. L'OTB-GSH ; la 4[S] OH OTA et la 4[R] OH OTA apparaissent dans le rein.

Pour les animaux du gr 11 (paroi de levure de bière), on observe aussi une différence importante entre le profil des métabolites rénaux et hépatiques. Dans le rein, on note la disparition des métabolites DC-OTHQ ; OTB ; OTC et F ; alors qu'apparaissent les métabolites OTB-GSH ; OT $\alpha$ . Le métabolite D s'amplifie considérablement.

Il ya une similitude entre les profils d'adduits au niveau du rein des animaux des deux groupes 10 & 11) ayant reçu les parois de levure boulangère et brassicoles. On note essentiellement la formation de deux adduits correspondant à l'un des adduits OTHQ et l'autre au C-C8 dG OTA. La formation de ce dernier adduit est corrélée à la disparition de l'OTB-GSH. Ces deux composés (OTB-GSH & C-C8dG OTA) sont formés par le même mécanisme (Hadjeba-Medjdoub *et al.*, 2012). L'entité réactive formée à partir de l'OTA réagit soit avec le GSH soit avec l'ADN, notamment au niveau de la guanine.

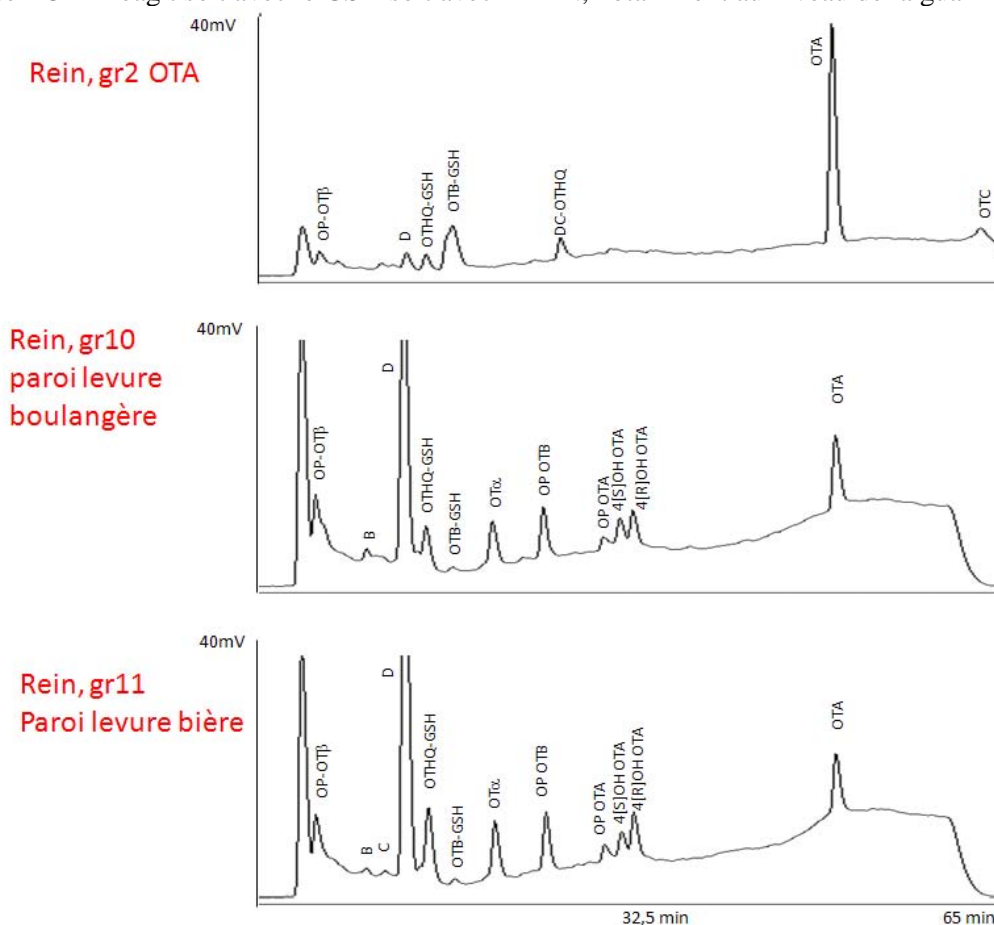


Figure 168 : Profil des métabolites rénaux d'animaux exposées à l'OTA seul (gr2) ou en présence de paroi de levure boulangère (gr10) ou de paroi de levure brassicole (gr 11)

### 2.4.7 Profil des métabolites dans les reins des animaux nourris avec OTA en présence de levures enrichies au GSH (groupe 3) ou enrichies en sélénométhionine (groupe 6)

Les métabolites retrouvés dans les reins des animaux ayant eu dans la rations un des deux levures enrichies (levure GSH et levure enrichie SeMet) ont été comparés (figure 169).

Dans le groupe 3 (GSH) par rapport au gr 2 (OTA seul), on constate la diminution du DC-OTHQ, une augmentation des métabolites D ; OTHQ-GSH ; OTB-GSH ; OTC ; OP-OTA et l'apparition des métabolites OTB ; 4 [S] OH OTA & 4[R] OH OTA.

Dans le groupe 6 (SE) par rapport au gr 2 (OTA seul), on constate la diminution du métabolite D, l'augmentation OTHQ-GSH ; OTB-GSH ; DC-OTHQ ; OP-OTA ; OTC et l'apparition des deux formes de l'OTHQ ; du 4S-OH-OTA et du métabolite Y.

Lorsque l'on compare le profil de métabolites au niveau du rein des animaux ayant ingéré la levure GSH et la levure SeMet, on constate qu'avec la levure SeMet, il y a une plus grande quantité de DC-OTHQ, la formation des deux formes d'OTHQ et de l'OTHQ-NAC. Par contre l'OT $\beta$  et les métabolites C & Y ne sont formés qu'avec la levure SeMet. Ces différences dans le profil métabolites expliquent la différence de génotoxicité. La levure sélénée a favorisé la formation des métabolites ayant un pouvoir génotoxique important.

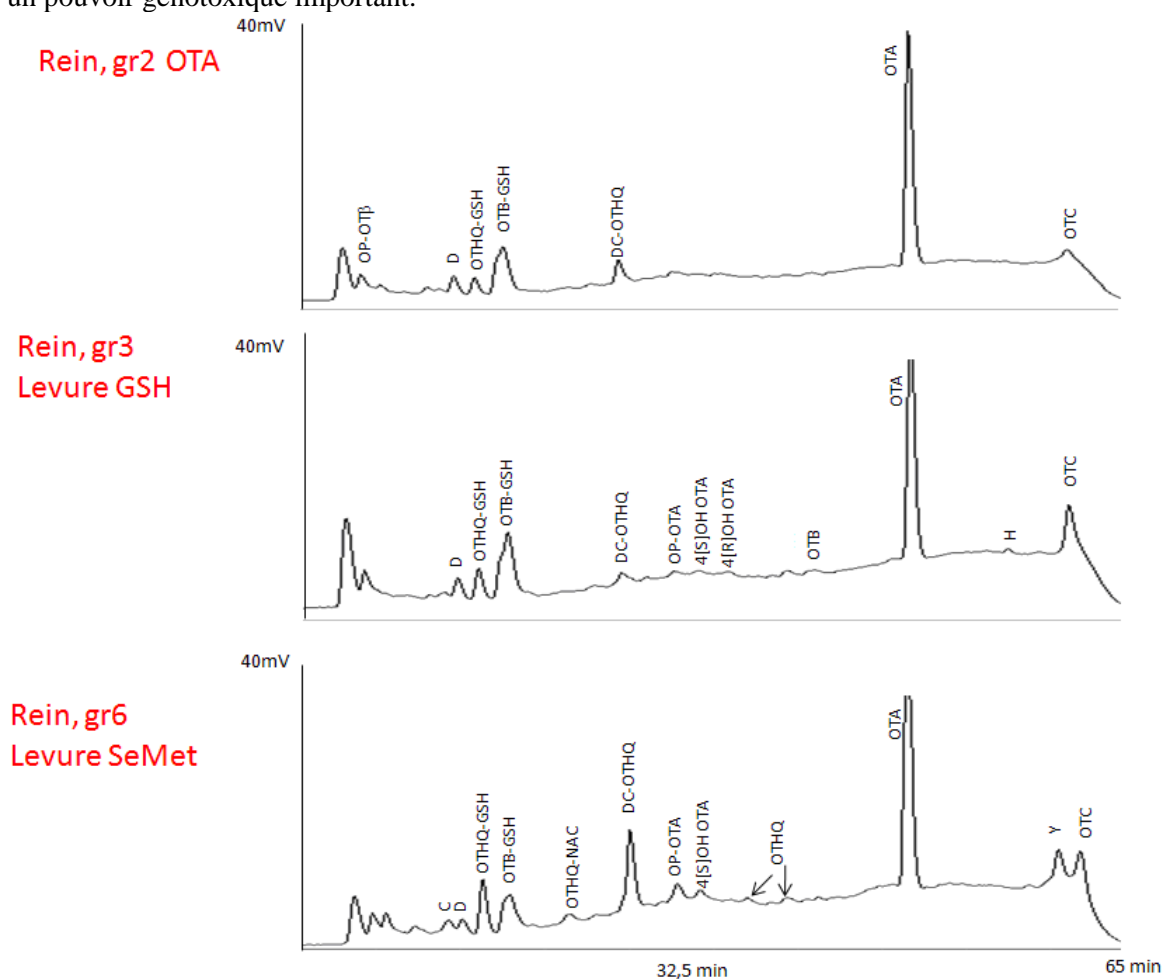


Figure 169 : Profil métabolique rénale des animaux exposés à l'OTA (gr 2) en présence de levure enrichie glutathion (GSH ; gr 3) ou levure sélénée (gr 6)

Le profil métabolique au niveau du rein et du foie des animaux du groupe 3 (levure GSH) est assez différent au niveau des métabolites liés au phénomène de glutathion conjugaison. L'OTHQ-NAC et l'OT $\alpha$  disparaissent. L'OTHQ diminue, par contre il y a formation d'une grande quantité d'OTB-GSH, métabolite non observé dans le foie.

Dans le groupe 6 (levure SeMet), on note de grandes différences entre foie et rein du point de vue qualitatif que quantitatif. Au niveau du rein, il y a formation des deux formes d'OTHQ alors



qu'aucune n'était formée dans le foie. D'autre part, il y a moins d'OTHQ-GSH formé par contre une grande quantité d'OTB-GSH apparaît ; l'OP OTB n'est plus formé dans le rein par contre une plus grande quantité de DC OTHQ est formée. Ceci s'explique par le fait que la SeMet comme le GSH interviennent dans la métabolisation des dérivés halogénés au niveau rénal. Les dérivés halogénés sont déhalogénés lors des réactions de glutathion conjugaison. Ceci conduit à deux produits glutathion conjugué : le dérivé conjugué au GSH au niveau de l'halogène (dans notre cas OTB-GSH) et au dérivé glutathion conjugué dans lequel l'halogène a été remplacé par un groupement OH (dans notre cas OTHQ-GSH). Au niveau du rein, la levure SeMet a engendré la formation de nombreux métabolites d'OTA ayant visiblement des propriétés génotoxiques.

#### **2.4.8 Conclusion concernant la métabolisation et la génotoxicité de l'OTA chez les poulets nourris avec de l'OTA et des dérivés de levures**

Cette étude *in vivo* montre clairement que l'adsorption de l'OTA à partir de l'aliment n'est pas suffisante pour limiter les effets génotoxiques. Dans le cas du charbon actif, le fait de retrouver de l'OTA dans les tissus de l'animal ainsi que des adduits, met en avant le fait que l'adsorption de l'OTA sur le charbon n'est pas stable. La seule adsorption n'explique pas non plus les effets observés avec les levures ou produits à base de levure. La meilleure adsorption observée avec la levure GSH ne se solde pas par une diminution significative d'OTA dans les tissus, ni par une diminution de la génotoxicité notamment au niveau du rein. Cette relative forte adsorption est due à la fixation de GSH sur l'OTA en présence de levure GSH. Virtuellement l'OTA disparaît car elle n'est plus sous forme libre ; mais peut être absorbée par l'organisme sous cette forme (Inoue *et al.*, 1982, 1984).

Les résultats obtenus avec la levure vivante mais également avec les levures entières inactivées indiquent que ces produits peuvent métaboliser directement l'OTA. En effet les levures possèdent des enzymes comme des carboxypeptidases (Félix & Labousse-Mercouroff, 1956 ; Félix & Brouillet, 1966) qui ne sont pas inactivées par le traitement que subissent les levures. Les parois de levure contiennent vraisemblablement aussi des enzymes capables de transformer l'OTA en forme ouverte (OP-OTA & OP-OTB), métabolites retrouvées en grandes quantités dans le foie et le rein des animaux des groupes 10 (parois de levure boulangère) et 11 (parois de levure brassicole).

D'autre part, au niveau intestinal, l'OTA peut aussi être métabolisée par les enzymes de la flore intestinale ainsi qu'au niveau des entérocytes. Ces métabolites n'ont pas la même affinité pour la fixation sur le charbon ou les produits à base de levures que l'OTA. Au lieu d'être éliminés dans les fèces, ces métabolites seront absorbés au niveau de l'intestin. Une fois absorbés certains de ces métabolites peuvent se reconvertir en OTA. Les formes ouvertes par exemple peuvent se former en milieu alcalin ou en présence de certaines enzymes. Une fois absorbées par l'organisme, ces formes ouvertes vont se reconvertir en OTA. La carboxypeptidase  $\beta$  de la levure de bière appelée également carboxypeptidase Y ou « protase » C est une endopeptidase agissant avec une grande spécificité sur des dipeptides ou tripeptides contenant de la phénylalanine de la leucine et de la méthionine (Félix & Brouillet, 1956). On comprend donc très bien que cette carboxypeptidase soit active sur l'OTA dont la partie peptidique est une phénylalanine. L'hydrolyse conduit à la formation d'OT $\alpha$  métabolite que l'on retrouve dans tous les foies de poulets ayant ingérés l'OTA et les divers additifs. L'OT $\alpha$  est aussi présente dans les reins sauf des poulets ayant ingérés les levures GSH et sélénées.

La toxicocinétique des métabolites est différente de celle de l'OTA. En général, les métabolites sont plus rapidement absorbés par l'organisme. Leur élimination de l'organisme est aussi plus rapide que celle de l'OTA ; et n'utilise pas forcément les mêmes transporteurs (Li *et al.*, 1997). Ainsi les demi-vies d'élimination respectives de l'OTA, de l'OP-OTA (correspondant à la lactone ouverte), de l'OT  $\alpha$ , de la 4-OH-OTA, de l'OTB (OTA déchloré) et de l'OTC (ester éthylique de l'OTA) sont les suivantes en heures :  $103 \pm 16$  ;  $50 \pm 2,8$  ;  $9,6 \pm 2,3$  ;  $6 \pm 0,9$  ;  $4,2 \pm 1,2$  ;  $0,6 \pm 0,2$ . La clairance corporelle totale pour l'OTA, l'OP-OTA, l'OT  $\alpha$ , la 4-OH-OTA, l'OTB et l'OTC *via* la bile, l'urine et la métabolisation est respectivement de 3,1 ; 3,6 ; 40 ; 65 et 43 ml / h  $\times$  kg. L'OTA, l'OTB et l'OT $\alpha$  sont essentiellement éliminées par les urines (> 48 %), la 4-OH-OTA par la bile (41 %) et l'OP-OTA comme métabolite urinaire (43 %). En conclusion, l'OTA est éliminée très lentement alors que les métabolites le sont nettement plus rapidement (Pfohl-Leskowicz & Castegnaro, 1999 chapitre OTA dans livre 1999).

Le tableau suivant récapitule la variation dans la métabolisation de l'OTA au niveau du rein et du foie en fonction des levures ingérées.

Tableau 65 : Récapitulatif des métabolites formés dans le foie et le rein des poulets

	OP-OTβ	OTβ	C	D	OTHQ GSH	OTB GSH	O T α	OTHQ NAC	OP-OTB	DC-OTHQ	OP-OTA	4S - O H	4R - O H	O T H Q	OTB	OTC
<b>FOIE</b>																
Témoin	+	+	+	+	++	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+/-	+
Charbon	+	+/-	+	+	+++	-	+	-	++	-	++	-	+	-	-	+
YCW boulang	+	-	+	+	+	-	+	+	++	-	++	-	-	-	-	++
YCW brasserie	+	+	+	+	+	-	-	-	-	++	++	-	+	-	+	++
Levure vivante	++	++	-	+	+++	-	+	+	-	++	+	-	+	+	+	+
GSH	++	-	+	+	++	-	+	++	++	+	+	+	+	+	-	+
Sélénée	++	-	+	+	++	-	+	+	++	++	++	+	-	+	-	+
<b>REIN</b>																
Témoin	+	-	-	+	++	++	-	(+)	-	++	(+)	(+)	(+)	-	-	+
Charbon	+	-	+	+	+++	-	+	-	++	-	+	+	-	-	-	-
YCW boulang	+	-	-	+	+++	+	+	-	++	-	++	+	+	-	-	-
YCW brasserie	+	-	+	+	+++	+	+	-	++	-	++	+	+	-	-	-
Levure vivante	+	-	+	+	+++	-	+	++	-	+++	++	+	+	+	-	-
GSH	+	-	-	+	++	+++	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Sélénée	+	+	+	+	++	++	-	+	-	+++	+	+	+	+	+	++

-absence du métabolite ; + intensité de la présence du métabolite ; augmentation en rouge par rapport au témoin ; diminution en vert par rapport au témoin ; pas de différence en blanc par rapport au témoin. YCW en violet = parois de levure ; levure vivante en orange ; GSH & Sélénée = levure entière inactivée en rose

D'une manière générale, plus de métabolites sont retrouvés dans les reins que dans le foie. Ceux retrouvés le plus fréquemment et en plus grande quantité sont les dérivés quinone comme OTHQ-GSH, OTB-GSH et DC-OTHQ pour lesquels une corrélation avec la formation d'adduits existe. En effet, la génotoxicité de l'OTA est liée à sa métabolisation faisant intervenir des mécanismes d'oxydation. Il a été montré précédemment que la voie de métabolisation conduisant à la forme quinone (OTHQ) était prépondérante dans la génotoxicité de l'OTA (Tozlovanu *et al.*, 2006 ; Faucet-Marquis *et al.*, 2006).

Nous avons résumé dans le tableau suivant la variation observée dans la formation des adduits au niveau du foie et du rein des poulets.

Tableau 66 : Récapitulatif des adduits formés dans le foie et le rein des poulets

FOIE	1 Q1	2	3	4 C- 8_dG OTA	5	6	7	8	9	10	X	autres
OTA	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Charbon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YCW boulangier	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YCW brasserie	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Levure vivante	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSH	+	+	-	-	++	+	++	+	-	-	+	-
SeMet	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
REIN												
OTA	+	++	++	+	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)	-	-
Charbon	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
YCW boulangier	++	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-
YCW brasserie	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
Levure vivante	++	-	-	++	-	-	-	+	-	+	+	a, b, c
GSH	+	-	-	++	-	-	-	++	-	-	+	a,b
SeMet	++	-	+	++	-	+	+	++	-	-	+	y, z

-absence du métabolite ; + intensité de la présence du métabolite ; augmentation en rouge par rapport au témoin ; diminution en vert par rapport au témoin ; pas de différence en blanc par rapport au témoin. YCW en violet = parois de levure ; levure vivante en orange ; GSH & Sélénée = levure entière inactivée en rose

Un lien entre OTB-GSH et adduit au niveau de la guanine (C-C8dG OTA) a été établi (Hadjeba-Medjdoub *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter que l'OTB-GSH n'est formé que dans le rein qui est l'organe cible. Lorsque le taux d'OTB-GSH diminue on note la formation d'une grande quantité de métabolite D de nature inconnue. La diminution de la formation d'OTB-GSH s'accompagne d'une diminution de la formation du C-C8dG OTA. Ceci s'explique par le fait que la métabolisation de l'OTA conduit à un métabolite réactif capable de réagir facilement avec les macromolécules nucléophiles comme le GSH ou l'ADN. Dans des études précédentes, il avait été montré que la formation de l'adduit C-C8dG OTA était stimulée lorsqu'il y avait surexpression de la COX2 et de la lipox (Petkova-Bocharova *et al.*, 2003 ; Pfohl-Leszkowicz & castgnaro, 2005 ; Manderville & Pfohl-Leszkowicz 2008). L'activité de ces deux enzymes est modulée par le GSH et la sélénométhionine.

La comparaison des profils d'adduits et de métabolites obtenus lors de l'exposition des cellules rénales humaines (HK2) à l'OTA et aux levures GSH ou sélénées, et les profils d'adduits et de métabolites au niveau des reins de poulets, présentent de grandes similitudes.

La diminution voire la disparition des adduits lors d'une co-exposition avec la levure GSH s'explique par la modification de la métabolisation de l'OTA vers la formation de dérivés 4 OH OTA et OTB. A l'inverse l'augmentation du nombre d'adduits aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif lors de la co-exposition aux levures sélénées est due à la métabolisation de l'OTA en dérivés OTHQ ; en OTHQ-NAC et DC OTHQ.

## **Conclusion et Perspectives**

---

Tout au long de la chaîne alimentaire, depuis le champ jusqu'à l'assiette du consommateur ou la mangeoire de l'animal, tel ou tel groupe de moisissures est susceptible de se développer et de produire des toxines si les conditions écologiques, notamment l'humidité, lui sont favorables. La contamination des aliments ou des graines peut avoir lieu avant ou pendant le stockage.

Les céréales sont des vecteurs très importants de mycotoxines car elles sont universellement consommées par l'homme et par les animaux. Elles peuvent être contaminées à plusieurs moments (en plein champ ou lors du stockage). La plupart des moisissures toxiques poussent sur l'aliment, diffusent dans la masse de l'aliment, élaborent des toxines y compris dans certains produits animaliers comme la viande ou le lait et provoquent des intoxications.

La présence dans les aliments de toxines produites naturellement est aléatoire et pose donc un problème de sécurité alimentaire. Ces moisissures et mycotoxines entraînent des problèmes économiques pour les marchands de grain (qualité pauvre du grain, baisse de rendement pour la production de céréales), pour les producteurs de volailles et de bétails (performances réduites des animaux et diminution de la reproduction, pertes dues aux maladies), les industries alimentaires fabriquant des produits pour les animaux et l'homme. Les causes indirectes sont la production de substances non vendables (due à la modification de l'aspect de l'aliment, altération des caractéristiques organoleptiques ou chimiques), un prix de revient augmenté pour la détoxification (protection par les antifongiques) ou destruction lorsque les substances sont trop contaminées. Pour les éleveurs cela implique une augmentation du prix d'achat des aliments non contaminés ou du coût entraîné par la décontamination de la nourriture ou par les soins aux animaux malades. Ceci entraîne à l'échelle mondiale des pertes estimées à 5 à 10 %.

La plupart des mycotoxines, quand elles atteignent un taux suffisant dans l'alimentation, sont responsables de toxicité aiguë ou chronique chez les animaux et l'homme. Les organes touchés sont le foie, le rein, le système immunitaire ou le système nerveux central. Elles sont aussi tératogènes. Elles peuvent même avoir des effets hormonaux impactant la reproduction des animaux. Chez l'homme, certaines de ces mycotoxines (aflatoxine, stérigmatocystine, ochratoxine A, fumonisines, fusarine) ont un effet insidieux dans la mesure où elles sont cancérogènes après exposition à long terme à faible dose *via* l'alimentation ou par inhalation de poussières en milieu professionnel (Pfohl-Leszkowicz, 2009). Les aflatoxines sont reconnues comme des hépato cancérogènes, mais sont également à l'origine de cancer pulmonaire après métabolisation en époxyde à l'origine d'adduit à l'ADN. Les fumonisines provoquent des cancers rénaux et hépatiques chez les animaux et sembleraient associées à des cancers de l'œsophage chez l'humain en perturbant les sphingolipides. L'ochratoxine A est à l'origine de cancers des voies urinaires supérieures après métabolisation en dérivés quinone réagissant avec l'ADN (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Ces effets toxiques ont été avérés sur la base d'études toxicologiques prenant en compte les mycotoxines isolément. C'est sur la base de ces études que sont établies les législations pour l'alimentation humaine et les recommandations pour les nourritures animales.

L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a publié un rapport montrant que la production des denrées agricoles n'est pas suffisante pour subvenir aux besoins de la population mondiale. De plus, au moins un quart de la récolte mondiale est contaminé par des mycotoxines (Rice & Ross, 1994 ; FAO, 1996).

C'est pour cette raison que le choix de la destruction des produits contaminés ou leur utilisation à des fins non-alimentaires, n'est pas facile. La mise au point de traitements industriels pour la décontamination/détoxification des denrées contaminées par les mycotoxines sont devenues les objectifs majeurs pour maintenir l'approvisionnement mondial en aliments.

Le protocole pour développer un programme de sécurité alimentaire ayant pour but de diminuer l'exposition aux aliments contaminés par des mycotoxines comprend plusieurs étapes incluant : 1) l'identification de ou (des) agent(s) toxique(s), 2) l'évaluation du danger, 3) la quantification de l'exposition, 4) la quantification du danger, 5) le contrôle du danger.

Notre thèse s'inscrit dans ces 5 points.

L'analyse de divers produits céréaliers (blé, riz, maïs) ainsi que le lait et le jambon a permis de mettre en évidence une multi-contamination systématique en mycotoxines. Les deux mycotoxines retrouvées quasiment dans tous les échantillons étaient la zéaralénone (ZEA) et l'ochratoxine A (OTA). Cette dernière est aussi assez fréquente dans le café. Dans plusieurs échantillons nous avons aussi retrouvé d'autres mycotoxines, en quantité non négligeable, comme les fumonisines (FB) et les trichothécènes.

Bien que dans les aliments pour humains les quantités retrouvées aient été en général en dessous des législations en vigueur, comme ces toxines se retrouvent dans plusieurs produits différents pouvant être consommés dans une même journée, nous avons constaté que les quantités journalières ingérées dépassent les doses journalières en mycotoxines cancérigènes. Ceci pose donc clairement le problème de l'exposition répétée à des doses pouvant entraîner des cancers. Ceci est d'autant plus inquiétant pour les enfants qui de par leur immaturité biologique et leur poids sont encore plus sensibles.

D'autre part les quelques études prenant en compte une multi-exposition aux mycotoxines ont mis en avant une amplification des effets (Speijers *et al.*, 1994 ; Corcuera *et al.*, 2011 ; pour une revue voir Grenier & Oswald, 2011), augmentation du risque que nous avons confirmée dans les études de terrains. En effet, la situation vis-à-vis de l'alimentation animale (croquettes; foin) n'est pas plus favorable. Dans ces nourritures plusieurs mycotoxines coexistent. Comme précédemment les quantités sont inférieures aux recommandations édictées pour les animaux de ferme. Néanmoins, nous avons clairement montré que ces co-contaminations sont suffisantes pour engendrer soit la mort des animaux (chats, cheval) soit diminuer la reproduction des animaux (chien, chat).

Ainsi il est répertorié dans la littérature que le cheval meurt par leucoencéphalomalacie lorsque le maïs est contaminé par des quantités en fumonisines supérieures à 10 mg/kg. Dans notre étude nous avons observé le décès des chevaux suite à l'ingestion de maïs ne contenant que 0,7 mg/kg. Il est à noter que ce maïs contenait d'autres mycotoxines comme l'ochratoxine A entre autre.

Ceci nous a conduit à réaliser des études expérimentales en culture cellulaire et sur animaux en combinant l'OTA à d'autres mycotoxines comme la citrinine (CIT), la FB ou la ZEA. Du point de vue génotoxicité (altération de la molécule d'ADN par formation d'adduits covalents) nous avons constaté que la génotoxicité de l'OTA était amplifiée dès lors qu'une autre de ces mycotoxines (FB, CIT, ZEA) était présente simultanément à l'OTA. La génotoxicité de l'OTA prime systématiquement sur celle des deux autres mycotoxines génotoxiques (CIT et ZEA). Ce phénomène est aussi observé au niveau des organes du chat dans lesquels nous avons observé des adduits spécifiques à l'OTA ; mais plus ceux liés à la ZEA. La coexposition des cellules à plusieurs mycotoxines ne conduit pas forcément à l'augmentation de la génotoxicité. Ainsi la présence simultanée de CIT (génotoxique) et de FB se solde au contraire par une inhibition de la génotoxicité de la CIT. Les mécanismes d'interaction vis-à-vis de la viabilité cellulaire sont plus complexes allant suivant les concentrations, les types cellulaires et les mycotoxines en présence, d'une amplification de la cytotoxicité à de la prolifération même avec des toxines n'entraînant pas de prolifération ou de cytotoxicité lorsqu'elle était seule. L'ensemble de ces études permettent d'affirmer :

- (i) que les mécanismes induisant la néphrotoxicité sont différents de ceux conduisant au cancer
- (ii) que les études de multi-contamination sont complexes, cela remet en cause les certitudes ayant permis d'élaborer les normes
- (iii) que les cellules sont un bon modèle d'étude puisque les réponses obtenues en culture cellulaire sont identiques à celle obtenues chez les animaux co-exposés que ce soit le chat, le cheval ou le porc (Stoev *et al.*, 2011 ; Diaz *et al.*, 2001).

Autant la cytotoxicité due au stress oxydatif peut être provoquée par toutes ces toxines, autant l'effet génotoxique est le résultat de la métabolisation en entité réactive comme la forme quinone pour l'OTA. La CIT, comme la ZEA et la FB induisent les enzymes (peroxydases, cytochromes P 450) impliquées dans la métabolisation de l'OTA en OTHQ (Manderville & Pfohl-Leskowicz, 2008). Ceci est confirmé par la modification du profil des métabolites.

L'ensemble des résultats obtenus dans les deux premières parties conforte l'hypothèse proposée par Stoev *et al* (1998 a ; 2002 a ; 2008 ; 2010 a, b), indiquant que le taux d'OTA à lui seul ne pouvait pas expliquer la néphropathie porcine ou la néphropathie endémique des Balkans ou en Afrique du Sud, mais que cela résulterait d'une interaction entre plusieurs mycotoxines. Des études récentes ont mis en évidence une fréquente co-contamination OTA/FB/ZEA en Croatie (Domijan *et al.*, 2005 ; 2010 Jurjevic *et al.*, 1999) et OTA/CIT en Bulgarie et Serbie (Vrabcheva *et al.*, 2000 ; Pfohl-Leskowicz *et al.*, 2007) ainsi que dans d'autres parties du monde où sévissent des néphropathies (Ghali *et al.*, 2008 ; Logrieco *et al.*, 2003 ; Bragulat *et al.*, 2008 ; Ibáñez-Vea *et al.*, 2012).

La contamination des produits finis ou des fourrages par les mycotoxines étant difficilement évitable de nombreuses approches préventives (bonne pratique agricole...) ou des procédés de détoxification sont en cours de développement pour éviter les effets toxiques chez les animaux (Kolosova & Stroka, 2011 ; Amézqueta *et al.*, 2012). Une approche relativement récente et prometteuse est l'adjonction

dans la nourriture des animaux de substances permettant l'adsorption des mycotoxines, les rendant moins bio-disponibles pour l'organisme. L'utilisation de telles substances en tant qu'additif alimentaire a officiellement été acceptée par l'Union Européenne en 2009 (EU, 2009).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons testé différents produits à base de levures pour leur propriété d'adsorbant ; mais également pour leur capacité à désactiver les toxines grâce à leurs propriétés antioxydantes. Nous avons montré dans l'étude *in vivo* chez le poulet que l'adsorption de l'OTA sur les produits de levures (levure entière, levure vivante, parois de levure) ne suffisait pas pour limiter l'absorption de l'OTA et ses effets génotoxiques. Les levures entières, mais également les parois de levures gardent la capacité à métaboliser l'OTA et modifie de ce fait la toxicocinétique de la substance. D'une manière générale tous les produits testés diminuent significativement le taux d'OTA dans le sang ; le foie et le rein, à l'exception de la levure glutathion. Ceci peut s'expliquer par le fait que sous forme glutathion conjugué l'OTA est facilement absorbé au niveau de l'intestin. La diminution du taux d'OTA dans les fluides biologiques et les organes n'est malgré tout pas suffisante pour inhiber totalement la génotoxicité de l'OTA, notamment au niveau du rein qui est l'organe cible. Les levures riches en glutathion et sélénométhionine diminuent l'impact génotoxique de l'OTA au niveau du foie. Par contre au niveau du rein, la levure sélénée n'est pas favorable. Ceci s'explique par le fait que la sélénométhionine (ou la sélénocystéine formé dans l'organisme) s'intègre dans les enzymes comme la glutathion peroxydase qui ne joue pas au niveau du rein un rôle désactivant pour l'OTA.

Dans cette partie nous avons à nouveau confirmé que la culture cellulaire pouvait être un bon modèle d'étude, puisque nous avons le même type de réponse en culture cellulaire de rein que dans les organes des poulets. Les levures glutathion et sélénées sont efficaces pour limiter la génotoxicité de l'OTA et de la zéaralénone au niveau des cellules des glandes mammaires (organes cibles pour la zéaralénone). La réponse est plus mitigée au niveau des cellules rénales vis-à-vis de l'OTA. Néanmoins les résultats sont encourageants et demandent à être poursuivis.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus ont permis de confirmer que les multi-contaminations sont préoccupantes car elles amplifient la réponse toxique. Dans l'avenir il faudra donc étudier plus en détails les effets engendrés par ces présences multiples, dans le but de définir avec plus de précision les doses sans effet. Ces études devraient permettre d'affiner les législations ainsi que les recommandations pour les nourritures animales.

D'autre part, il serait aussi intéressant de développer des méthodes d'analyses multi-mycotoxines, car pour l'instant pour avoir des résultats sensibles, il est nécessaire de réaliser des analyses mycotoxines par mycotoxines. Les méthodes d'extraction devraient être affinées. D'autre part, il faudrait pouvoir mettre au point des techniques d'analyse utilisant des purifications par d'autres moyens que des colonnes d'immunoaffinité qui sont souvent à l'origine de sous estimation et ne permettent pas de purifier les métabolites qui sont souvent plus important du point de vue toxicité.

Finalement, la mise au point de moyen de désactivation doit être poursuivie. Lorsque les mécanismes de biotransformation de ces toxines et les métabolites responsables des effets seront identifiés, il sera possible de mieux orienter le développement des agents désactivants. Il serait intéressant de tester la combinaison de plusieurs dérivés de levures (combinaison celle au GSH et celle à la sélénométhionine) ; ou bien les combiner avec d'autres substances.

Il faudrait aussi étendre les études à d'autres animaux (porc, bovins...) et à d'autres mycotoxines.

## **Références bibliographiques**

---



A

- Abbès, S., Ouanes, Z., ben Salah-Abbe`s, J., Houas, Z., Oueslati, R., Bacha , H., Othman, O. (2006a). The protective effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate against haematological, biochemical and pathological changes induced by Zearalenone in mice, *Toxicon* 47, 567–574
- Abbès, S., ben Salah-Abbe`s, J., Ouanes, Z., Houas, Z., Othman, O., Bacha , H., Abdel-Wahhab, M-A., Oueslati, R. (2006b). Preventive role of phyllosilicate clay on the Immunological and Biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice, *International Immunopharmacology* 6 (8), 1251-1258.
- Abbès, S., Ouane, Z., Ben Salah-Abbès, J., Abdel-Wahhab, M-A., Oueslati, R., and Bacha, H. (2007). Preventive role of aluminosilicate clay against induction of micronuclei and chromosome aberrations in bone-marrow cells of Balb/c mice treated with Zearalenone, *Mutation research, Genetic toxicology and environmental mutagenesis* 631 (2), 85-92.
- Abid-Essefi, S., Baudrimont, I., Hassen,W., Ouanes,Z., Mobio, T.A., Anane, R., Creppy, E., E, Bacha, H. (2003). DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK,Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E.Toxicology. 192, 237-248.
- Abid-Essefi, S., Ouanes, Z., Hassen,W., Baudrimont, I., Creppy, E., and Bacha, H. (2004). Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone.Toxicology in Vitro. 18(4) 467-474
- Abramson, D., Mills, J.T., Boycott, B.R.(1983). Mycotoxins and Mycoflora in Animal Feedstuffs in Western Canada. *Can. J. Comp. Med.* 47, 23-26.
- Abrunhosa, L., Serra, R., Venancio, A. (2002). Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7493– 7496.
- Abrunhosa, L.; Santos, L.; Venâncio, A. (2006). Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnol.* 20, 231–242.
- Abrunhosa, L., Paterson, R.M., and Venâncio, A. (2010). Review Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. *Toxins* 2010, 2, 1078-1099.
- AFSSA. (2009). Rapport final. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale.
- Ahamed, S., Foster, J.S., Bukovsky, A.& Wimalasena, J. (2001). Signal transduction through the ras/Erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone-induced cell-cycle progression in MCF-7 cells. *Mol.Carcinog.* 30, 88-98.
- Ahmed, N. and G.C. Ram. (1986). Nuclear lipid peroxidation induced in rat liver by T-2 mycotoxin. *Toxicol.* 24, 947-949
- Alexandrov, K., Becker, M., Frayssinet, C., Dubowska, W., and Guerry, R. (1982). Persistence of benzo[alpha]pyrenediolepoxide DNA adduct in mouse skin. *Cancer Letters.* 16, 247-251.
- Allcroft, R and Lewis, G. (1963). Groundnut toxicity in cattle: experimental poisoning of calves and a report on clinical effects in older cattle. *Vet. Rec.* 75, 487-491.
- Alm, H., Greising, T., Brüßow ,K.-P ., Torner, H., Tiemann,U. (2002). The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on in vitro maturation of pig oocytes and in vitro culture of pig zygotes. *Toxicology in Vitro.* 16(6), 643-648
- Ambrose, A. M., and De Eds, F. (1945). Acute and subacute toxicity of pure citrinin. *Proc.Soc.Exp.Bol.Med.* 59, 289-291.
- Ambrose, A. M., and DeEds, F. (1946). Some toxicological and pharmacological properties of citrinin. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 88, 173-186.
- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., López de Cerain, A. (2009). Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* 20, 326-333.
- Amézqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., López de Cerain, A., Guiraud, JP. (2012). OTA-producing fungi in foodstuffs: A review *Food Control* 26, 256-268.
- Angioni, A., Caboni, P., Garau, A., Farris, A., Orro, D., Budroni, M., Cabras, P. (2007). In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 2043-2048.
- Ankrah, NA., Addo, P G A., Abrahams, CA., Ekuban, FA., Addae, MM. (1993). Comparative effects of AFG<sub>1</sub> and AFB<sub>1</sub> at levels within human exposure limits on mouse liver and kidney. *West Afr J Med.* 12, 105-109.
- Araguas, C., Gonzalez-Penas, E., Lopez de Cerain, A. (2005). Study on Ochratoxin A in cereal-derived products from Spain, *Food Chem.* 92, 459-464.
- Armondo, M.R., Dogi, C.A., Pizzolitto, R.P., Escobar, F., Peirano, M.S., Salvano, M.A., Sabini, L.I., Combina, M., Dalcero, A.M., Cavaglieri, L.R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with in vitro aflatoxin A binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. *World mycotoxin journal* 4(1), 59-68.

- Arora, RG; Frolen H; Nilsson, A. (1981). Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. *Acta Vet Scand.* 22, 638-641.
- Aroyeun, S.O and Adegoke, G.O. (2007). Reduction of ochratoxin A (OTA) in spiked cocoa powder and beverage using aqueous extracts and essential oils of *Aframomum danielli*. *African Journal of Biotechnology.* 6, 612-616
- Asao, T., Buchi, G., Abdelkader M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. (1963). Aflatoxins B and G<sub>1</sub>. *J Am Chem.Soc.* 85, 1706-1707.
- Asao, T., Buchi, G., Abdelkader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. (1965). Structures of Aflatoxins B and G<sub>1</sub>. *J Am Chem.Soc.* 87, 822-826.
- Assaf, H., Azouri, H., Pallardy, M. (2004). Ochratoxin A induces apoptosis in human lymphocytes through down regulation of Bcl-x L. *Toxicol Sci.* 79, 335-344.
- Atroschi, F., Biese, I., Saloniemi, H., Ali-Vehmas, T., Saari, S., Rizzo, A., and Veijalainen, P. (2000). Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. *J. of Phar. and Pharm. Sci.* 3, 281-291.
- Avantaggiato, G., Havenaar, R., and Visconti, A. (2007). Assessment of the Multi-mycotoxin-Binding Efficacy of a Carbon/Aluminosilicate-Based Product in an In Vitro Gastro intestinal Model. *J.Agric.FoodChem.* 55, 4810-4819.
- Awad, W.A., Vahjen, W., Aschenbach, J.R., Zentek, J. (2011). A diet naturally contaminated with the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON) downregulates gene expression of glucose transporters in the intestine of broiler chickens. *Livestock Sciences* (in press)
- Ayed, Y., Ayed-Boussema, I., Ouanes, Z., Bacha, H. (2011). In vitro and in vivo induction of chromosome aberrations by alpha- and beta-zearalenols: Comparison with zearalenone. *mutation research.* Sous presse.
- Azcona-Olivera, J.I., Ouyang, Y., Murtha, J., Chu, F.S. and Pestka, J.J. (1995). Induction of cytokine mRNAs in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): relationship to toxin distribution and protein synthesis inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 133(1), 109-20.
- Azemar, B. (2000). Etude du rôle de l'ochratoxine A, une mycotoxine alimentaire, dans l'induction des cancers des voies urinaires chez l'homme. Mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse 244p.

## B

- Bakutisi, B., Baliukoniene, V., Paskevicius, A. (2005). Use of biological method for detoxification of mycotoxins. *Botanica Lithuanica.* 7, 123-129
- Bailey, W.S., and Groth, A.H. (1959). The relationship of hepatitis X in dogs and moldy corn poisoning of swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 134, 483-486.
- Bailey, E.A., Iyer, R.S., Stone, M.P., Harris, T.M., and Essigmann, J.M. (1996). Mutational properties of the primary aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct. *Proceedings of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 93. 1535-1539.
- Bailly, J.D., Raymond, I., Le Bars, P., Guyomard, Y., Abadie, J., Le Bars, J., Guerre, P., Delverdier, M., & Burgat, V. (1996). Leucoencéphalomalacie des équidés : Cas rapportés au CNITV. *Rev. Méd. Vét.* 147, 787-796.
- Balzer, D., Tardieu, D., Bailly, J-D., and Guerre, P. (2004), les trichothécènes : nature des toxines, présence dans les aliments et moyens de lutte. *Revue Med. Vet.* 155(6), 299-314.
- Bartholomew, R.M., Rayan, D.S. (1980). Lack of mutagenicity of some phytoestrogens in the *Salmonella* mammalian microsome assay. *Mutat Res.* 78, 317-321.
- Barraud, L., T. Douki, S. Guerret, M. Chevallier, C. Jamard, C. Trepo, C.P. Wild, J. Cadet and L. Cova. (2001). The role of duck hepatitis B virus and aflatoxin B<sub>1</sub> in the induction of oxidative stress in the liver. *Cancer Det. and Prev.* 25, 192-201.
- Bascaran, V., Hernandez de Rojas, A., Choucino, P., Delgado, T. (2007). Analysis of ochratoxin A in milk after direct immunoaffinity column clean-up by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1167, 95-101
- Bata, A., and Lasztity, R. (1999). Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 223-228.
- Baptista, A.S., Horii, J., Calori-Domingues, M.A., da Glória, E.M., Salgado, J.M., and Vizioli, M.R. (2004). The Capacity of Manno-Oligosaccharides, Thermolysed Yeast and Active Yeast to Attenuate Aflatoxicosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(5). 475-481.
- Battista, J.R., and Marnett, L.J. (1985). Prostaglandin H synthase-dependent epoxidation of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Carcinogenesis* 6 (8). 1227-1229.

- Batista, L.R., Chalfoun, S.M., Prado, G., Schwan, R.F and Wheals, A.E.(2003). Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.).*International Journal of Food Microbiology* 85, 293–300.
- Batista, L.R., Chalfoun, S.M., Silva, C.F., Cirillo, M., Varga, E.A and Schwan, R.F. (2009).Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control*. 20, 784–790
- Battaccone,G., Nudda A., and Pulina, G.(2010). Effects of Ochratoxin A on Livestock Production. *Toxins*. 2, 1796-1824.
- Baudrimont, I., Ahouandjivo, R., and Creppy, E.E. (1997a). Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several agents. *Chem. Biol. Interact*. 104,29-40.
- Baudrimont, I., Betbeder, A.M. and Creppy, E.E. (1997b). Reduction of the ochratoxin A-induced cytotoxicity in Vero cells by aspartame. *Arch. Toxicol*. 71(5), 290-298.
- Bauer, J., Niemiec, J., and Scholtyssec, S. (1988). Ochratoxin A in der legehennen futter. 2 Mitteilung : Rückstände in serum, leber und ei. *Arch. Gefluegelkd*, 52, 71-75.
- Bauer, J. (1994). Möglichkeiten zur Entgiftung mykotoxinhaltiger Futtermittel. *Monatsh. Veterina`rmed*. 49, 175–181.
- Bejaouii, H., Mathieu, F., Taillandier, P., & Lebrihi, A. (2004), Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1038–1044.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A. (2006). Biodegradation of ochratoxi A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 255,203-208.
- Belmadani A., Steyn PS., Tramu G., Betbeder AM., Baudrimont I., Creppy EE. (1999).Selective toxicity of Ochratoxin A in promary cultures from different brain regions. *ArchToxicol*.73, 108-114.
- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J S., Cortés, M A., Yusá , V., Hernández, F.(2010). UhpIc-Ms/Ms Highly Sensitive Determination of Aflatoxins, the Aflatoxin Metabolite M<sub>1</sub> and Ochratoxin a In Baby Food And Milk. *Food Chemistry*.
- Bernabucci, U., Colavecchia, L., Danieli, P.P., Basiricò, L., Lacetera, N., Nardone, A., Ronchi, B.(2011). Aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> affect the oxidative status of bovine periphe blood mononuclear cells.*Toxicology in vitro*. 25(3), 684-691
- Ben Salah-Abbès, J., Abbès, S., Houas, Z., and Oueslati, R. (2009). *Raphanus sativus* extract prevents and ameliorates zearalenone-induced peroxidative hepatic damage in Balb/c mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61(11), 1545-1554.
- Benzuidenhout S.C., Gelderblom W.C.A., Gorst-Allman R.M.M., Marasas W.F.O., Spiteller G., and Vleggaar R. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J Chem Soc Chem Commun* 11, 743-745.
- Berndt, W. O. (1983). Transport of citrinin by renal cortex. *Arch.Toxicol*. 54, 35-40.
- Beretta B, De Domenico R, Gaiaschi A, Ballabio C, Galli CL, Gigliotti C and Castani P .(2002). Ochratoxin A in cereal-based baby foods: Occurrence and safety evaluation. *Food Add Contam*, 19 (1), 70-75.
- Betina, V. (1993). Chromatography of mycotoxins : techniques and applications. *Journal of Chromatography Library*, Elsevier.
- Betina, V. (1994). Bioactive secondary metabolite of microorganisms. *Progress in industrial microbiology*. Elsevier.
- Bhat, R.V., Beedu, S.R., Ramakrishna, Y. and Munshi, K.L. (1989). Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India. *Lancet.*, 1(8628), 35-37.
- Bhat, R.V., Ramesh V., and Vasanthi S. (1999). Mycotoxin contamination of foods and feeds: overview, occurrence and economic impact on food availability, trade, exposure of farm animals and related economic losses. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins. Tunis, Tunisia, 1999, 12-27.
- Biasucci, G., Calabrese, G., DiGiuseppe, R., Carrara, G., Colombo, F., Mandelli, B., Maj, M., Bertuzzi, T., Pietri, A., Rossi, F. (2011). The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits. *Eur J Nutr*. 50, 211-218
- Biehl ML., Prelusky DB., Koritz GD., Hartin KE., Buck WB., Trenholm HL.(1993). Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharamacol*. 121, 152-159.
- Bintvihok, A., Thiengnin, S., Doi, K., Kumagai, S. (2002). Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. *J.Vet.Med Sci*. 64 (11) 1037-1039.
- Biro, K., Solti, L., Barna-Vetro, I., Bago, G. et al.( 2002).Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and Elisa and histopathological effects in chickens, *Avian Pathol*. 31, 141 –148.
- Bizaj, E., Mavri1, J., Čuš, F., and Raspor, A. (2009). Removal of Ochratoxin A in *Saccharomyces cerevisiae* Liquid Cultures. *S. Afr. J. Enol. Vitic*. 30(2). 151-155.

- Blanc, P.J., Laussac, J.P., Le Bars, J., Loret, M.O., Pareilleux, A., Prome, D., Santerre, A.L., and Goma, G. (1995). Characterization of monascidin A from *Monascus as citrinin*. *Int.J.Food Microbiol.* 27, 201-213.
- Blank, R., and Wolffram, S. (2009). Effects of live yeast cell supplementation to high concentrate diets on the toxicokinetics of ochratoxin A in sheep. *Food Additives and Contaminants*, 26(1), 119–126.
- Blood, D.C., Henderson, J.A., Radostits, O.M., Arundel, J.H., Gay, C.C. (1979). *Veterinary Medicine*, 5<sup>th</sup> edition, Ballière Tindall, London, 1135.
- Bodine, A.B & Mertens, D.R. (1983). Toxicology, metabolism and physiological effects of aflatoxin in the bovine; In: Diener UL, Asquith RL & Dickens JW (eds) *Aflatoxin and Aspergillus in corn*. Southern cooperative Series Bulletin 279. Auburn University, Auburn, Alabama 46-50.
- Böhm, J., Razzai-Fazeli, E. (2005). Effects of mycotoxins on domestic pet species. In *The Mycotoxin Blue Book*; Diaz, D., Ed.; Nottingham University Press: Nottingham, UK, 77-91.
- Bony, S., Olivier-Loiseau, L., Carcelen, M., Devaux, A. (2007). Genotoxic potential associated with low levels of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol and fusarenon X in a human intestinal cell line. *Toxicol Vitro*. 21, 457-465.
- Boorman, G.A. (1989). NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A. Boorman eds. NIH publications n°89-2813, US dept. of health and human services. National Institute of Health, research triangle park, NC.
- Bose, S., and Sinha, S. P. (1994). Modulation of ochratoxin-produced genotoxicity in mice by vitamin C. *Food and Chemical Toxicology*. 32, 533-537.
- Böswald, C., Engelhardt, G., Vogel, H., Wallnöfer, P.R. (1995). Metabolism of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol by yeast strains of technological relevance. *Nat. Toxins*. 3, 138-44.
- Boudra, H., Barnouin, J., Dragacci, S., Morgavi, D.P. (2007). Aflatoxin M1 and Ochratoxin A in Raw Bulk Milk from French Dairy Herds. *J. Dairy Sci.* 90, 3197-3201.
- Boutibonnes, P., Lemarinier, S. (1981). Cytologic alteration induced in *Bacillus thuringiensis* by zearalenone, *Mycopathologia*. 74, 107-111.
- Bozzo, G., Ceci, E., Bonerba, E., Desantis, S., Tantillo, G. (2008). Ochratoxin A in laying hens: high performance liquid chromatography detection and cytological and histological analysis of target tissues. *J Applied Poultry Res.* 17, 151-156.
- Bozzo, G., Ceci, E., Pinto, P., Bonerba, E., Martella, V., Terio, E., Tantillo, G. (2009). Ochratoxin A in avicultural meat production: chemical and histological effects. *World Mycotoxin Journal*, 2(1) 61-69.
- Bozzo, G., Bonerba, E., Ceci, E., Colao, V., Tantillo, G. (2011). Determination of ochratoxin A in eggs and target tissues of experimentally drugged hens using HPLC–FLD *Food Chemistry* 126, 1278–1282.
- Bragulat, M.R., Martinez, E., Castella, G., Cabanes F.J. (2008). Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *Int J.Food microbiology*, 126, 43–48
- Brake, J., Hamilton, P.B., Kittrell, R.S. (1999). Effects of trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol on fertility and hatchability of broiler breeders. *Poult Sci.* 78, 1690-1694.
- Brake, J., Hamilton, P.B., Kittrell, R.S. (2000). Effects of trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol on feed consumption, body weight and oral lesions of broiler breeders. *Poult Sci.* 79, 856-863.
- Brendt, W. O. (1989). Potential involvement of renal transport mechanisms in nephrotoxicity. *Toxicology Letters* 46, 77-82.
- Breitholtz-Emmanuelson, A., Olsen, M., Oskarsson, A., Palminger, I., and Hult, K. (1993). Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *Journal of the association of official analytical chemists*, 76, 842-846.
- Breuninger, L.M., Paul, S., Gaughan, K., Miki, T., Chan, A. Aaronson, S.A., Kruh, G.D. (1995). Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Res.* 55, 5342-5347
- Brown, M. H., Szczech, G. M., and Purmalis, B. P. (1976). Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 37, 331-338.
- Brown, T.P., Rottinghaus, G.E. & Williams, M.E. (1992). Fumonisin mycotoxicosis in broilers : performance and pathology. *Avian Dis.* 36, 450-454
- Bucci, T.J. & Howard, P.C. (1996). Effect of fumonisin mycotoxins in animals. *J. Toxicol.Toxin rev.* 15, 293-302.
- Bullerman, L.B., Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 140-146.
- Burger, B H-M., Abel, S., Snijman, P.W., Swanevelder, S., Gelderblom, WCA. (2007). Altered Lipid Parameters in Hepatic Subcellular Membrane Fractions Induced by Fumonisin B1. *Lipids*, 42, 249-261.

## C

- Cai, Q., Tang, L., Wang, J.S. (2007). Validation of biomarkers in F344 rats. *Tox Appl Pharmacol*, 225, 28-39.
- Caldwell, J. (1980). Comparative aspects of detoxication in mammals. In: W. B. Jakoby (Ed.) *Enzymatic*

- Basis of Detoxication, 1, Ch. 5. Academic Press, New York, NY.
- Campbell, T.C., and Hayes, J.R. (1976). The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. *Toxicology and applied pharmacology* 35(2), 199–222.
- Canadas, D. (2006). Evaluation du procédé Oxygreen® pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Les effets toxiques liés à une exposition sub-chronique à l'ochratoxine A sont-ils atténués? Thèse de l'Institut national polytechnique.
- Carvet, S., and Lecœur, S. (2006). Les Fusariotoxicoses des animaux d'élevage. *Méd. Vét.* 150, 43-55.
- CAST. (2003). Mycotoxins : risks in plant, animal, and human systems. Rep.139 ; Ames IOWA.
- Casteel, S.W., Turk, J.R., Cowart, R.P., and Rottinhaus. (1993). Chronic toxicity of fumonisin in weanling pigs. *J Vet Diagn Invest*, 5, 413-417.
- Castegnaro, M. (1999). Risques cancérogènes - Les aflatoxine. Dans "Les mycotoxines dans l'alimentation: evaluation et gestion du risque" de conseil supérieur d'hygiène publique de France. Technique et Documentation, Paris.
- Castegnaro, M., and Pfohl-Leschkowicz, A. (2002). Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. Sécurité alimentaire du consommateur, 2<sup>ème</sup> édition ; Moll, M. ; Moll, L., Editions TEC&DOC, Lavoisier.
- Casteganro, M., Tozlovanu, M., Wild, C., Molinié, A., Sylla, A., and Pfohl-Leschkowicz, A. (2006a). Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Mol Nut Res* 50, 480-487.
- Categnaro, M., Canadas, D., Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N., Pfohl-Leschkowicz, A. (2006b). Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular Nutrition & food research* 50(6), 519-529.
- Cavalieri, E.L., and Rogan, E.G. (2002). A unified mechanism in the initiation of cancer. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*. 959, 341-354.
- Cecchini, F., Morassut, M., Garcia Moruno, E., and Di Stefano, R. (2006). Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology*. 23, 411–417
- Celik, K., Denli, M., Erturk, M., Ozturkcan, O., Doran, F. (2001). Evaluation of Dry Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Compounds in the Feed to Reduce Aflatoxin B, (AFB,) Residues and Toxicity to Japanese Quails (*Coturnix coturnix japonica*). *J.Appl. Anim. Res* 20. 245-250
- Center, S.A. (2004). Metabolic, antioxidant, nutraceutical, probiotic, and herbal therapies relating to the management of hepatobiliary disorders. *Vet Clin N Am Small Anim Pract* 2004;34: 67–172.
- Chabaub, M. (2007 thèse). Utilisation des antioxydants en hépatologie chez les carnivores domestiques. Université Claude –Bernard –LYON1 (Médecine - Pharmacie).
- Chang, A. Y., and Keng, P. C. (1983). Inhibition of cell growth in synchronous human hypernephroma cells by recombinant interferon alpha-D and irradiation. *Journal Of Interferon Research* 3, 379-385.
- Chatterjee, D., & Mukherjee, S.K. (1994). Contamination of Indian maize with fumonisin B1 and its effects on chicken macrophage. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 251-253.
- Chen, JQ., Yager, J.D. And, Russo, J. (2005). Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *BBA-Mol Cell Res.* 1746, 1–17.
- Chen, T., and Wong, Y.S. (2009). Selenocystine induces reactive oxygen species mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 63, 105-113
- Chernozemsky, I.N., Stoyanov, I.S., Petkova-Bocharova, T.K., Nicolov, I.G., Draganov, I.V., Stoichev, I.I., Tanchev, Y., Naidenov, D., and Kalcheva, N.D. (1977). Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in vratzha district, Bulgaria. *International Journal Of Cancer*. 19, 1-11.
- Chi MS., Mirocha CJ. (1978). Necrotic oral lesions in chickens fed diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, and crotoxin. *Poult. Sci.* 57, 807-808.
- Choi, Y.K., Jung, K.K., Chae, K.Y., Jang I., Lee, B.D and Nahm, K.H. (1995). Effects of vitamin E and selenium supplementation to diets containing aflatoxin B<sub>1</sub> on the contents of liver lipids and various blood parameters in rats. *Asian-Austr. J. of Anim. Sci.* 8:379-385.
- Christ, E.J., and Van Dorp, D.A. (1972). Comparative aspects of prostaglandin biosynthesis in animal tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 270(4). 537- 545.
- Chu, FS. (2002). Mycotoxins. In *Foodborne Diseases*, 2nd ed.; Cliver, DO, Riemann, H., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, 271-303.
- Coles, B., D.J. Meyer, B. Ketterer and C.A. Stanton. (1985). Studies on the detoxication of microsomally activated aflatoxin B1 by glutathione and glutathione transferases in vitro. *Carcinogenesis* 6, 693-697.
- Collins, T. F.X., Sprando, R.L., Black, T.N., Olejnik, N., Eppley, RM., Alam, H.Z., Rorie, J., Ruggles, DI. (2006). Effects of zearalenone on in utero development in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 44(9) 1455-1465

- Colvin, B.M., Harrison, L.R., Gosser, H.S. & Hall, R.F. (1984). Aflatoxicosis in feeder cattle. *Am. Vet. Med. Assoc.*, 184, 956-958.
- Colvin, B.M., and Harrison, L.R. (1992). Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia*, 117, 79-82.
- Combs, G.F., & Gray, W.P. (1998). Chemopreventive agents selenium. *Pharmacol Ther*, 79 ; 179-192.
- Cook, W.O., Richard, J.L., Osweiler, G.D, Trampel, D.W. (1986). Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis : Rumen motility and tissues and fluid concentrations of AFB<sub>1</sub> and AFM<sub>1</sub>. *Am.J.Vet. Res* 47, 1817-1825.
- Cooray, R. (1984). Effects of some mycotoxins on mitogen-induced blastogenesis and SCE frequency in human lymphocytes. *Food Chem Toxicol*, 22, 529-534.
- Corbett, W.T., Brownie, C.F., Hagler, S.B. & Hagler, W.M. (1988). An epidemiological investigation associating aflatoxin M1 with milk production in dairy cattle. *Vet. Hum. Toxicol.* 30, 5-8.
- Corcuera, L.A., Arbilla, L., Vettorazzi A., Azqueta, A., López de Cerain, A. (2011), Ochratoxin A reduces aflatoxin B1 induced DNA damage detected by the comet assay in Hep G2 cells. *Food & Chemical toxicology*, 49 2883-2888.
- Côté, L.M., Dahlem, A.M., Yoshizawa, T., Swanson, S.P., & Buck, W.B. (1986). Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine and feces lactating dairy cows. *Dairy Sci.*, 69, 2416-2423.
- Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol.Lett.* 127, 19-28.
- Creppy, E., Chiarappa, P., Baudrimont, I., Borracchi, P., Moukha, S., and Carratù, M.R. (2004). Synergistic effects of fumonisin B<sub>1</sub> and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? *Toxicology*, 201, 115-123
- Cui, X.S., Torndal, U.B., Eriksson, L.C., Moller, L. (1995). Early formation of DNA adducts compared with tumor formation in a long term tumor study in rats after administration of 2-nitrofluorene, *Carcinogenesis*. 16, 2135-2141.
- Cullen, J.M., Newberne, P.M. (1994). Acute hepatotoxicity of aflatoxins. *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*; Eaton, D.L., Groopman, J.D., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, 3-26.
- Curtui, V. G., Gareis, M., Usleber, E and Märtlbauer, E. (2001). Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. *Food Additives and Contaminants* 18(8), 730-738

## D

- Dai, J., Park, G, Perry, J.L., Ill'ichev Y.V., Bow, D.A.J., Pritchard, J.B., Faucet, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R. & Simon, J.D. (2004). Molecular aspects of the transport and toxicity of ochratoxin A. *Account Chem Res* 37 (11) 874-881
- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Bertuzzi, T., Moseriti, A., Pietri, A., Dossena, A., Marchelli, R. (2010). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food Chemistry*. 120, 978-983.
- Damu, P.R. (2007). Studies on ochratoxin A induced teratogenicity in rats with special reference to minimum teratogenic dose, critical time and its amelioration. *Indian Journal of Veterinary Pathology*. 31( 2), 189.
- Danicke, S., Swiech, E., Buraczewska, L., Ueberschar, K.H. (2005). Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 89, 268-276.
- Dänicke, D.S., Goyarts, T., and Valenta, H. (2007). On the specific and unspecific effects of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent on piglets when fed with uncontaminated or with Fusarium toxins contaminated diets. *Archives of Animal Nutrition* 61(4), 266-275.
- Dansette, P.M., Bonierbale, E., Minoletti, C., Beaune, P.H., Pessayre, D., and Mansuy, D. (1998). Drug-induced immunotoxicity. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 23(4), 443-451.
- D'arce, L.P.G., De Syllos Colus I.M. (2000). Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil, *Teratogen. Carcinog. Mutagen.* 20, 161-170.
- Datta, K., and Kulkarni, A. P. (1994). Inhibition of mammalian hepatic glutathione S-transferases by acetylenic fatty acids. *Toxicology Letters* 73, 157-165.
- Davegowda, G., Raju, MVLN et Swang, HVLN. (1998). Mycotoxins: novel solutions for their counteraction. *Feedstuffs*, 70, 12-15.
- Debouck, C., Haubruge, E., Bollaerts, P., van Bignoot, D., Brostaux, Y., Werry, A., Rooze, M. (2001). Skeletal deformities induced by the intraperitoneal administration of deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. *Int Orthop* 25, 194-198.
- Decaprio, A.P. (1997). Biomarkers: coming of age for environmental health and risk assessment, *Environ. Sci. Technol.* 31, 1837-1848.
- De Felice, D.V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., Lima, G., Visconti, A., Castoria, R. (2008). Strains of



- Aureobasidium pullulans can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology*, 98, 1261-1270
- Degen, G.H., and Neumann, H.G. (1981). Differences in aflatoxin B<sub>1</sub>- susceptibility of rat and mouse are correlated with the capability in vitro to inactivate aflatoxin B<sub>1</sub>epoxide. *Carcinogenesis* 2(4), 299-306
- Degen, G.H., Eling, T.E., and McLachlan, J.A. (1982). Oxidative metabolism of diethylstilbestrol by prostaglandin synthetase. *Cancer Research*. 42, 919-923.
- Degen, G. H. (1993). SEMV cell cultures: a model for studies of prostaglandin-H synthase-mediated metabolism and genotoxicity of xenobiotics. *Toxicology Letters* 67, 187-200.
- Degen, G. H., Gerber, M. M., Obrecht-Pflumio, S., and Dirheimer, G. (1994). Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cells. *Arch.Toxicol.* 71, 371.
- Degen, G.H, Mayer, S., Blaszkewicz, M. (1997). Biomonitoring of ochratoxin A in grain workers, *Mycotoxin research*, 23(2) 88-93.
- Decant, W., Berthold, K., Vamvakas, S., Henschler, D., Anders, M.W. (1988). Thioacylating intermediates as metabolites of S(1-2 dichlorovinyl)-L-cysteine and S-(1,2,2-trichlorovinyl)-L-cystéine formed by cysteine conjugate beta-lyase. *Chem. Res. Toxicol.* 1(3), 175-178.
- Dekant, W., and Vamvakas, S. (1989). *Drug Metab. Rev.* 20,43-83.
- Delattre, J., Beauceux, J.L., and Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier, Paris, 549
- De Leval, X., Delarge, J., Somers, F., de Tulio, P., Henrotin, Y., Pirotte, B., and Dogné, J. M. (2000). Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. *Current Medical Chemistry* 7, 1041-1062.
- Del Prete, V., Rodriguez, H., Carrascosa, A.V., Rivas, B.D.L., Garcia-Moruno, E., Munoz, R. (2007). In vitro removal of ochratoxine A by wine lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 70, 2155-2160.
- Denli, M., Blandon, J.C., Guynot, M.E., Salado, S., Perez, J.F. (2008). Efficacy of a New Ochratoxin- Binding Agent (Ocratox) to Counteract the Deleterious Effects of Ochratoxin A in Laying Hens. *Poult. Sci.* 87, 2266–2272.
- Dereje, T., Cathrine F. Kure, Ragnhild O. Gjerde, Solveig Langsrud, Mohamed K. Omer, Truls Nesbakken, Ida Skaar. (2010). A HACCP plan for mycotoxigenic hazards associated with Dry-cured meat production processes. *Food control.* 22 (6), 831-837.
- Devegowda, G., Arawind, B.I.R., and Morton, M.G. (1996). Saccharomyces cerevisiae and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers. *Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium, Sydney* . 103–106.
- Diaz, CT., Sogbe, E., Ascanio, E., Hernandez, M. (2001). Ochratoxin A and fumonisin B<sub>1</sub> natural interaction in Pigs: clinical and pathological study. *Revista Científica*, 10 (4) 314-321.
- Diaz, G.J., Squires, E.J., Julian, R.J., Boermans, H.J. (1994). Individual and combined effects of T-2 toxin and DAS in laying hens. *Br. Poult. Sci.* 35, 393-405.
- Dilkin, P., Zorette, P., Mallmann, C.A., Gomes J. D., Utiyama, C. E., Oetting, L.L., Correa, B. (2003). Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B(1) and fumonisin B(1)- containing Fusarium moniliforme culture material in weaned piglets. *Food Chem Toxicol.* 41, 1345-1353.
- D'mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., and Placinta, C.M. (1999). Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 80, 183-205.
- Dogi, C.A., Armando, R., Luduen, R., de Moreno de LeBlanc, A., Rosa, C.A.R., Dalcero, A., and Cavaglieri, L. (2011). Saccharomyces cerevisiae strains retain their viability and aflatoxin B<sub>1</sub> binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food Additives and Contaminants.* 28 (12). 1705–1711.
- Doll, S., Danicke, S., Valenta, H., and Flachowsky, G., (2004). In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone, *Archives of animal nutrition*, 58 (4), 311-324.
- Doll, S., Gericke, S., Danicke, S., Raila, J., Ueberschar, K.-H., Valenta, H., Schnurrbusch, U., Schweigert, F.J., and Flachowsky, G. (2005). The efficacy of a modified aluminisilicate as a detoxifying agents in Fusarium toxin contaminated maize containing diets for piglets. *J .Anim. physiol. Anim.Nutr* 89(9), 342-358
- Donnelly, PT., Stewart, R.K., Ali, S.L., Conlan, A.A., Reid, K.R., Petsikas, D., and Massey, T.E. (1994). Biotransformation of aflatoxin B<sub>1</sub> human lung. *Carcinogenesis* 17(11), 2487-2494.
- Domijan, A.M., Peraica, M., Jurjevic, Z., Ivic, D., Cvjetkovic, B. (2005). Fumonisin B<sub>1</sub>, fumonisin B<sub>2</sub>, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. *Food Additives and Contaminants*, 22(7), 677-680.
- Domijan, A M., Zeljezi, D., Kopjar, N and Peraica, M. (2006). Standard and Fpg-modified comet assay in kidney cells of ochratoxin A- and fumonisin B<sub>1</sub>-treated rats. *Toxicology* 222, 53–59.
- Domijan, A.M., Peraica, M., Markov, K., and Fuchs, R. (2009). Urine ochratoxin A and sphinganine/sphingosine ratio in residents of the endemic nephropathy area in Croatia. *Arh Hig Rada Toksikol*, 60, 387-393
- Ducros, V., and Favier, A. (2004) Metabolisme du selenium. *Endocrinologie.* 1, (1), 19-28.

- Dunn, B. B., Stack, M. E., Park, D. L., Joshi, A., Friedman, L., and King, Rl. (1983). Isolation and identification of dihydrocitrinone, a urinary metabolite of citrinin in rats. *J.Toxicol.Environ.Health* 12, 283-289.
- Duthie, I.F., Lancaster M.C., Taylor, J., Thomas, D.C., Shacklady, C.A., Att field, P.H., Fuller-Lewis, E. (1966). Toxic groundnut meal in feeds for pigs. A trial made at two laboratories with pigs from about 40 to 200lb live weight fed a restricted scale. *Vet Rec* 79, 621-625.
- Duvick, J., and Rood, T.A. (2000). Zearalenone detoxification compositions and methods. 71. US patent 6074838, Pioneer Hi-Bred International, Inc. (Des Moines, IA)
- Dvorska, J.E., and Surai, P.F. (2001). Stimulating effect of aflatoxin B1 on lipid peroxidation in the in vitro model systems. Scientific programme and abstracts of 6th International Symposium on Poisonous Plants, Glasgow, UK, 21.
- Dvorska, J., Pappas, A., Karadas, F., Speake, B., Surai, P. (2007). Protective effect of modified glucomannans and organic selenium against antioxidant depletion in the chicken liver due to T-2 toxin-contaminated feed consumption. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 145, 582-587.
- Dwivedi, P., and Burns, R.B. (1984). Effect of ochratoxin A on immunoglobulins in broilers chicks. *Res Vet Sci*, 36, 117-121.

## E

- Eder, E. (1999). Intra individual variations of DNA adduct levels in humans, *Mutat. Res.* 424, 249-261.
- Eder ,S., Benesic, A., Freudinger, R., Engert, J., Schwerdt, G., Drumm, K., Gekle, M. (2000). Nephritogenic ochratoxin A interferes with mitochondrial function and pH homeostasis in immortalized humankidney epithelial cells. *PXugers Arch* 440,521-529.
- Edgar Tinyiro, S., Yao, W., Sun, X., Wokadala, C., and Wang, S. (2011). Scavenging of Zearalenone by *Bacillus* Strains-in vitro. *Research Journal of Microbiology*, 6(3), 304-309.
- EFSA. (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on arequest from the Commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal* (2004). 101, 1-36-Q-2003-039.
- El Adlouni, C., Pinelli, E., Azémar, B., Zaoui, D., Beaune, P., and Pfohl-Leszkowicz, A. (2000). Phenobarbital increases DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A : role of CYP 2C9 and microsomal glutathione-S-transferase. *Environ.Mol.Mutagen.* 35, 123-131.
- El Aldouni, C., Tozlovanu, M., Naman, F., Faid, M., and Pfohl-Leszkowicz, A.(2006).Preliminary data on the presence of mycotoxratoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives "Greek style" of Moroccan origin.*Mol.Nutr.Food Res.*50,507-512
- El Barkouky, E. M., Mohamed, F. R., Atta, A. M., Abu Taleb, A. M., El Menawey, M.A., and Hatab, M.H. (2010). Effect of *saccharomyces cerevesiae* and vitamin c supplementation on performance of broilers subjected to ochratoxin A contamination. *Egypt. Poult. Sci.* 30 (I). 89-113.
- El-deeb, B.A. 2005. Isolation and characterization of soil bacteria able to degrade zearalenone. *J. Bot.*, 32, 3-30.
- El Golli-Bennour,E., Kouidhi, B., Bouslimi, A., S Abid-Esse, S., Hassen, W., and Bacha, H.(2010).Cytotoxicity and Genotoxicity Induced by Aflatoxin B1, Ochratoxin A,and heir Combination in Cultured Vero Cells.*J biochem molecular toxicology.* 24(1), 42-45.
- Elling, F., Hald, B., Jacobsen, C., and Krogh, P. (1975). Spontaneous toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*.Section A, Pathology 83, 739-741.
- El-Nezami, H.S., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S., Mykkanen, H. 2002. Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Addit. Contam.*, 19, 680-686.
- El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salmimen, S., Mykkanen, H. (2002). Binding explain the interaction of txo food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative  $\alpha$ -zearalenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(7), 3545-3549.
- El-Nezami, H., Polychronaki, N., Lee, Y.K., Haskard, C., Juvonen, R., Salminen, S., Mykknen, H. 2004. Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *J. Agr. Food Chem.*, 52, 4577-4581.
- El Sharkawy, S.H., Mustafa, I.S., Mohamed, S.A., Halaweish, F.T. (1991). Microbial transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 449-552.
- El-Tras, W.F., El-Kady, N.N., Tayel, A.A. (2011). Infants Exposure to Aflatoxin M<sub>1</sub> as a Novel Food borne Zoonosis. *Food and Chemical Toxicology.* 49(11), 2816-1819.
- Elzupir, A.O., Makawi, S.Z.A., Elhussein A.M. (2009). Detreminatin of aflatoxins and ochratoxin A in dairy Cattle feed and Milk in Wad Medani, Sudan. *Journal of animal and veterinary advances* 8(12). 2508-2511.
- Endo, M., and Kuroda, M. (1980). Citrinin an inhibitor of cholesterol synthesis. *J.Antibiot.* 939, 841-843.
- Eriksen, G.S., Pettersson, H and Lindberg, J.E. (2003). Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. *Arch. Tierernahr.*, 57(5), 335-45.



- Eriksen, G.S., Pettersson, H. (2004). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim.Feed Sci. Technol.* 114, 205-239.
- Eskola, M., Parikka, P., Rizzo, A. (2001). Trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone contamination and fusarium Infection in Finnish cereals samples in 1998. *Food Addit. Contam.* 18, 707-718.
- Essigman, J. M.; Croy, R. G.; Bennet, R. A. and Wogan, G. N. (1982), Metabolic activation of aflatoxin B<sub>1</sub>: pattern of DNA adduct formation, removal and excretion in relation to carcinogenesis, *Drug Metabol. Rev.*, 13, 581-602.
- Etienne, M. and Wache, Y. 2008. Biological and physiological effects of deoxynivalenol (DON) in the pig. *Mycotoxins in Farm Animals*. Oswald, I.P. and Taranu, I. Kerala, India, Research Signpost, 113-130.
- European Union (2002). "Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states". SCOOP Task 3.2.7. Directorate-General Health and Consumer Protection.
- European Commission (EU, 2009). Commission regulation (EC)N° 386/2009 of 12 May 2009 amending regulation EC n° 1831/2003 of the European Parliament and the Council as regards the establishment of a new functional group of feed additives. *Official Journal of the European Union* L 118:66.
- Ewald, C., Heer, A. (1989). The sperm quality of 4 boars during the assimilation of mycotoxin-contaminated feed (ochratoxin A) and after changing feed-a case study. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 102, 261-266.

## F

- Faixova, Z., Faix, Š., Bourutov, R., Leng, L. (2007). Efficacy of Dietary Selenium to Counteract Toxicity of Deoxynivalenol in Growing Broiler Chickens, *Acta Vet. BRNO* 76, 349-356
- Falany, C.N. (1997). Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J.* 11, 206-216.
- FAO. (2003). Etude FAO Alimentation et Nutrition. Reglementation relatives aux mycotoxines dans les produits humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003.
- FAO. (1996). Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1996). Basic facts of the world cereal situation, *Food Outlook*. No. 5/6.
- Farmer, P.B., and Shuker, D.E.G. (1999). What is the significance of increases in background levels of carcinogen-derived protein and DNA adducts? Some considerations for incremental risk assessment, *Mutat. Res.* 424, 275-286.
- Farmer, P.B., (1999). Studies using specific biomarkers for human exposure assessment to exogenous and endogenous chemical agents, *Mutat. Res.* 428, 69-81.
- Farmer, P.B. (2004). DNA and protein adducts as markers of genotoxicity, *Toxicology* 149, 3-9.
- Faucet, V., A. Pfohl-Leszkowicz, J. Dai, M. Castegnaro and R.A. Manderville, (2004a). Evidence for covalent DNA adduction by ochratoxin A following chronic exposure to rat and subacute exposure to pig. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1289-1296
- Faucet, V., Lebeau C., Castegnaro M., and Pfohl-Leszkowicz A. (2004b). Correlation between DNA adduct formation and OTA metabolites in opossum kidney cells. *Toxicology Letters* 144, s66.
- Faucet-Marquis, V. (2005). L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérigène génotoxique ou épigénétique ? Recherche des effets génotoxiques par la technique de post-marquage de l'ADN au <sup>32</sup>P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A, mémoire de thèse, INP, Toulouse.
- Faucet-Marquis V., Pont F., Størmer F.C., Rizk T., Castegnaro M., and Pfohl-Leszkowicz A. (2006). Evidence of a new dechlorinated ochratoxin A derivative formed in opossum kidney cell cultures after pretreatment by modulators of glutathione pathways: Correlation with DNA-adduct formation. *Molecular Nutrition & Food Research*. 50(6), 530-542.
- Faucet-Marquis\*, V, Hadjeba-Medjdoub\*, K, Joannis-Cassan C, Ballet, N and Pfohl-leszkowicz, A. (2012). Development of an in vitro method for the prediction of mycotoxin adsorption on yeast based products: case of Zearalenone, Ochratoxin A and Aflatoxin B<sub>1</sub>. (en cours de soumission).
- Félix, F., and Labousse-Mercoureff, J. (1956). Sur une carboxypeptidase de levure de brasserie. *Biochimica & Biophysica Acta*, 21(2) 303-308 .
- Félix, F., and Brouillet, N. (1966). purification and properties of two peptidases from brewer's yeast, *Biochimica & Biophysica Acta*, 122 (1) 127-144.
- Ferrufino-Guardia, E.V., Tangni, E.K., Larondelle, Y., and Ponchaut, S. (2000). Transfer of ochratoxin A during lactation : exposure of suckling via the milk of rabbit does fed a naturally-contaminated feed, *Food Additives and contaminants*, 17, 167-175.
- Fink-Gremmels, J., & Malekinejad, H. (2007). Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 326-341.
- Firmin, S., Gandia, P., Morgavi, D.P., Houin, G., Jouany, J.P., Bertin, G., Boudra, H. (2010). Modification of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A toxicokinetics in rats administered a yeast cell wall preparation . *Food Additives and Contaminants* 27(8). 1153-1160.

- Firmin, S., Morgavi, D. P., Yiannikouris, A., and Boudra, H. (2011). Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B1 absorption in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 94,5611–5619.
- Fitzpatrick, D.W., Picken, C.A., Murphy, L.C., Buhr, M.M. (1989). Measurement of the relative affinity of zearalenone, alpha-zearalenol and beta-zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: an indicator of estrogenic potencies. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 94, 691-694.
- Franco, C. M., Fente, C. A., Vazquez, B., Cepeda, A., Lallaoui, L., Prognon, P., and Mahuzier, G. (1996). Simple and sensitive high-performance liquid chromatography-fluorescence method for the determination of citrinin Application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. *Journal of Chromatography A.* 723, 69-75.
- Frizzell, C., Ndossi, D., Verhaegen, S., Dahl, E., Eriksen, G., Sørli, M., Ropstad, E., Muller, M., Elliott, C.T., Connolly, L. (2011). Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha-and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicology letters.* 206(2),210-217.
- Fruhauf, S., Schwartz, H., Ottner, F., Krskaa, R., and Vekirua, E. (2011). Yeast cell based feed additives: studies on aflatoxin B<sub>1</sub> and zearalenone. *Food Additives and Contaminants.* 1, 1-15.
- Fuchs, R., Radic, B., Ceovic, S., Sostaric, B., and Hult, K. (1988). Enterohepatic circulation of ochratoxin A in rats. *Period.Biol.* 90, 39-42.
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., Knasmüller, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1398-1407.

## G

- Gajecka, M., Jakimiuk, E., Polak, M., Otrocka-Domagala, I., Janowski, T., Zwierzchowski, W., Obremski, K., Zielonka, L., Apoznanski, J., and Gajecki, M. (2004a). Zearalenone applied per os provides adverse effects in structure of chosen parts of bitch reproductive system. *Pol. J. Vet. Sci.* 7, 59-66.
- Gajecka, M., Jakimiuk, E., Skorska-Wyszynska, E., Zielonka, L., Polak, M., Paluszewski, A., Rybarczyk, L., Gajecki, M. (2004b). Influence of zearalenone mycotoxicosis on selected immunological, haematological and biochemical indexes of blood plasma in bitches. *Pol. J. Vet. Sci.* 7, 175-180.
- Gajecka, M., Rybarczyk, L., Zwierzchowski, W., Jakimiuk, E., Zielonka, L., Obremski, K., Gajecki, M. (2011). The effect of experimental, long-term exposure to low-dose zearalenone mycotoxicosis on the histological condition of ovaries in sexually immature gilts. *Theriogenology* 75, 1085–1094
- Galtier, P., and Alvinerie, M. (1976). In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras, *Ann. Rech. Vet.* 7, 91-98.
- Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Piva, A., Chies, L., Galvano, M. (1998). Activated carbons. In vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J. Food Prot.* 61, 469–475.
- Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., and Galvano, G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review, *journal of food protection*, 64(1), 120-131.
- Ganther, H.E. (1986). Pathways of selenium metabolism including respiratory excretory products, *J. Am. Coll. Toxicol.* 5, 1–5.
- Garavito, R. M., and DeWitt, D. L. (1999). The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1441, 278-287.
- Gareis, M., Mrtbauer, F., Bauer, J., Gedek, B. (1988). Determination of ochratoxin A in breast milk, *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 186, 114–117 (in German).
- Gareis, M., Reubel, G., KNoning, T., Porzig, R. (1987). Ein Fall von infektosem welpensterben bei Afghanen in verbindung mit der verfütterung von ochratoxin A-Haltigem Milchpulver. *Tieraeztl Umsch*, 42, 77-80.
- Gareis, M. (1996). Fate of ochratoxin A on processing of meat products. *Food Additives And Contaminants* 13, 35-37.
- Gareis, M., Scheuer, R. (2000). Ochratoxin A in meat and meat products. *Arch. Lebensmittelhygi*, 51, 102-104.
- Garland, T.; Reagor, J. (2001). Chronic canine aflatoxicosis and management of an epidemic. In *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium*; deKoe, W., Samson, R., van Egmond, H., Gilbert, J., Sabino, M., Eds.; Ponsen and Looven: Wageningen, The Netherlands. 231-236.
- Garret, W.N., Heitman Jr H., Booth A.N. (1968). Aflatoxin toxicity in beef cattle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127, 188-190.
- Gaskell, S.J. (1997). Electrospray: Principles and Practices. *J. Mass Spectrom.* 32, 677- 688.
- Gaumy, J.L., Bailly, J.D., Burgat, V., Guerre, P. (2001). Zéaralénone : propriétés et toxicité expérimentale. *Revue Méd. Vét.* 152, 219-234.
- Gautier, J.C., D. Holzhaeuser, J. Markovic, E. Gremaud, B. Schilter and R.J. Turesky. (2001). Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radical Bio. and Med.* 30:1089-1098.

- Gekle, M., Silbernagl, S., Mildenerberger, S., and Freudinger, R. (1993). Effect on dome formation and uptake of ochratoxin A in proximal tubule-derived Opossum kidney cell monolayer. *Cellular physiology and biochemistry* 3, 68-77.
- Gekle, M., and Silbernagl, S., (1994). The role of the proximal tubule in ochratoxin A nephrotoxicity in vivo. *Toxicodynamic and toxicokinetic aspects, Renal Physiol. Biochem.*17, 40–49.
- Gekle, M., Martinez, C., Mildenerberger, S., Freudinger, R., Schwerdt, G., Sauvart, C., Silbernagl, S. (1998). Susceptibility of human epithelial cells to the ubiquitous food contaminant ochratoxin A. *Proceedings 20th Mykotoxin-Workshop (Detmold):* 76-80
- Gekle, M., Schwerdt, G., Freudinger, R., Mildenerberger, S., WilXingseder, D., Pollack, V., Dander, M., Schramek, H. (2000). Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *J Pharmacol Exp Ther.* 293, 837–844.
- Gekle, M., Sauvart, C., Schwerdet, G. (2005). Ochratoxin A at nanomolar concentrations: a signal modulator in renal cells. *Mol Nutr Food Res* 49,118–130.
- Gelderblom W.C., Jaskiewicz., Marasas W.F., Thiel P.G., Horak R.M., Vleggaar R., and Kriek N.P. (1988). Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol*, 54, 1806-1811.
- Gelderblom, W.C., Lebepe-Mazur, S., Snijman, P.W., Abel, S., Swanevelder, S., Kriek, N.P., and Marasas, W.F. (2001). Toxicological effects in rats chronically fed low dietary levels of fumonisin B<sub>1</sub>. *Toxicology*, 161, 39-51.
- Gelderblom, W.C.A., Marasas, W.F.O., Lebepe-Mazur, S., Swanevelder, S., Vessey, C.J., Hall, P.M. (2002) Interaction of fumonisin B<sub>1</sub> and aflatoxin B<sub>1</sub> in a short-term carcinogenesis model in rat liver. *Toxicology*. 171, 161-173.
- Gelderblom, W.C.A., Marasasa, W.F.O., Lebepe-Mazura, S., Swanevelder, S., Abel, S. (2008). Cancer initiating properties of fumonisin B1 in a short-term rat liver carcinogenesis assay. *Toxicology* 250, 89-95.
- Gentles, A., Smith, E.E., Kubena, L.F., Duffus, E., Johnson, P., Thompson, J., Harvey, R.B., Edrington, T.S. (1999). Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers. *Poult. Sci.* 78, 1380–1384.
- Ghali, R., Hmaissia-khlifa, K., Ghorbel, H., Maarouf, K., Hedili, A. (2008). Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. *Food Control* 19, 921–924.
- Ghedira Chekir, L, K., Maaroufi, A., Zakhama, F., Ellouz, S., Dhouib, Creppy, E.E., and Bacha, H. (1998). Induction of a SOS repair system in lysogenic bacteria by zearalenone and its prevention by vitamin E. *Chem. Biol. Interact.* 113 ,15-25.
- Glahn, R. P., Shapiro, R. S., Vena, V. E., Wideman, R. F., and Huff, W. E. (1989). Effects of chronic ochratoxin A and citrinin toxicosis on kidney function of single comb White Leghorn pullets. *Poult.Sci.* 68, 1205-1212.
- Gilani, S. H., Bancroft, J., and Reily, M. (1978). Teratogenicity of ochratoxin A in chick embryos. *Toxicology and Applied Pharmacology* 46, 543-546.
- Gimeno, A., Martins, M.L. (2008). Mycotoxins and mycotoxicoses in animals and humans, *Special Nutrients, Inc. USA (Ed.) Victor Mireles Communications, Mexico City (Mexico)* pp 1-127.
- Godschalk, R.W.L., Van Schooten, F.J., Bartsch, H. (2003). A critical evaluation of DNA adducts as biological markers for human exposure to polycyclic aromatic compounds, *J. Biochem. Mol. Biol.* 36, 1–11.
- Golinski, P., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Chelkowski, J., Hult, K., and Kostecki, M. (1991). Possible sources of ochratoxin A in human blood in Poland. *IARC Scientific Publications* 153-158.
- Gong, Y.Y., Torres-Sanchez, L., Lopez-Carrillo, L., Peng, J.H., Sutcliffe, AE., White, K.L., Humpf, H.U, Turner, PC., Wild, CP. (2008). Association between Tortilla Consumption and Human Urinary Fumonisin B1 Levels in a Mexican Population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17(3), 688–694.
- Gonzalez, H.H.L., Martinez, E.J., Pacin, A.M., Resnik, S.L., Sydenham, E.W. (1999). Natural co-occurrence of fumonisins, DON, zearalenone and aflatoxin in field trial corn in Argentina.16, 565–569.
- González-Osnaya, L., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J.(2007).Simple liquid chromatography assay for analyzing ochratoxin a in bovine milk. *Food Chemistry*.108(1), 272-276.
- Gopee, N.V., He, Q., Sharma, R.P. (2003). Fumonisin B<sub>1</sub>-induced apoptosis associated with delayed inhibition of protein kinase C, nuclear factor B and tumor necrosis factor in LLC-PK cells. *Chem Biol Inter.* 146,131–145
- Gopinandhan, T.N., Kannan, G.S., Panneerselvam, P., Velmourougane, K., Raghuramulu,Y and Jayarama. (2008). Survey on ochratoxin A in Indian green coffee destined for export. *Food Additives and Contaminants:PartB*.1(1),51-57.
- Gopalan, P., Jensen, D.E., and Lotlikar, P.D. (1992). Glutathione conjugation of microsome-mediated and synthetic aflatoxin B<sub>1</sub>-8,9-oxide by purified glutathione S-transferases from rats. *Cancer Letters* 64(3), 225-233.

- Gratz, S., Mykkänen, H., Ouwehand, A. C., Juvonen, R.O., Salminen, S., and El-Nezami, H. (2004). Intestinal Mucus Alters the Ability of Probiotic Bacteria To Bind Aflatoxin B<sub>1</sub> In Vitro . *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10), 6306-6308.
- Gratz, S. (2007). Aflatoxin Binding by Probiotics, Experimental Studies on Intestinal Aflatoxin Transport, Metabolism and Toxicity, (thèse).
- Greene, C.E., Barsanti, J.A., and Jones, B.D. (1977). Disseminated intravascular coagulation complicating aflatoxicosis in dogs. *Cornell Vet.*, 67, 29-69.
- Gruier, B., Oswald, I. (2011). Mycotoxin co contamination of food and feed: meta-analysis of publication describing toxicological interactions. *World Mycotoxin Journal*, 4, 285-313.
- Griessler, K., (2008), Counteracting mycotoxins in animal feed. In : Binder, E.M. and Schatzmayr, G., (eds), *World Nutrition Forum, The future of animal production*, Nottingham University Press, UK, 227-240.
- Grosse, Y., Pfeifer, A., Mace, K., Harris, C.C., Dirheimer, G., and Pfohl-Leszkowicz. (1994). Biotransformation of ochratoxin A by human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) expressing human cytochrome P450s and implication of glutathione conjugation. *Toxicology Letters* 74, 32-33.
- Grosse, Y., Chekir-Ghedira, L., Huc, A., Obrecht-Pflumio, S., Dirheimer, G., Bacha, H., and Pfohl-Leszkowicz, A. (1997). Retinol, ascorbic acid and [alpha]-tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer Letters*. 114, 225-229.
- Groten, J.P., Tajima, O., Feron, V.J., Schoen, E.D. (1998). Statistically designed experiments to screen chemical mixtures for possible interactions. *Environ. Health Perspect.* 106, 1361-1365.
- Groves, C.E., Morales, M., and Wright, S.H. (1998). Peritubular transport of ochratoxin A in rabbit renal proximal tubules. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 284, 943-948.
- Groves, F.D., Zhang, L., Chang, Y.S., Ross, P.F., Casper, H., Norred, W.P.J. (1999). *AOAC Int* ;82:657-62.
- Gruenert, D. C., Basbaum, C. B., and Widdicombe, J. H. (1990). Long-term culture of normal and cystic fibrosis epithelial cells grown under serum-free conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Journal Of The Tissue Culture Association* 26, 411-418.
- Gstraunthaler, G. (1988). Epithelial cells in tissue culture. *Renal Physiol Biochem*. 11, 1-42.
- Gunsen, U., and Yaroglu, T. (2002). Aflatoxin in dog and horse feeds in Turkey. *Vet. Hum. Toxicol.* 44, 113-114.
- Gupta, M., Bandyopadhyay, S., Sasmal, D., and Majumder, S. K. (1979). Effects of ochratoxin A and citrinin on Kidney functions. *IRCS Med. Sci. Pharmacol.* 7, 466-475.
- Guthrie, L.D. (1979) Effects of aflatoxin in corn on production and reproduction in dairy cattle. *J dairy Sci.* 62, 134.
- Gurtoo, H.L., and Dave, C.V. (1975). In vitro metabolic conversion of aflatoxins and benzo (a) pyrene to nucleic acid binding metabolites. *Cancer Res* 35, 382

## H

- Ha, T.G., Kim, N.D. (1998). 2-(allylthio)pyrazine inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub>-induced hepatotoxicity in rats: inhibition of cytochrome P450 2B- and 3A2-mediated bioactivation. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 102:69-78.
- Hadjeba-Medjdoub, K., Tozlovanu, M., Pfohl-Leszkowicz, A., Frenette, C., Paugh, R.J., and Manderville, R.A. (2012). Structure-Activity Relationships Imply Different Mechanisms of Action for Ochratoxin A-Mediated Cytotoxicity and Genotoxicity. *Chem. Res. Toxicol* 25 (1), 181-190.
- Hadjeba-Medjdoub, K., El Adlouni, C., Manderville, R.A., and Pfohl-Leszkowicz, A. (2012). Admixture of Ochratoxin A and Fumonisin B<sub>1</sub> Stimulates Proliferation and a Synergistic Increase in Mitogen-Activated Protein Kinase Activity in Human Kidney Cells. *Chem Res Toxicol* (soumis).
- Haazele, F.M., Guenter, W., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A. (1993). Beneficial effects of dietary ascorbic acid supplement on hens subjected to ochratoxin A toxicosis under normal and high ambient temperatures. *Can. J. Anim. Sci.* 73, 149-157.
- Hagelberg, S., Hult, K., and Fuchs, R. (1989). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal Of Applied Toxicology: JAT* 9, 91-96.
- Halabi, K.S., Natour, R.M., Tamini, S.O. (1998). Individual and combined effects of chronic ochratoxin A and zearalenone mycotoxins on rat liver and kidney. *Arab Gulf J. Scient. Res.* 16, 379-392.
- Halász, A., Lásztity, R., Abonyi, T., and Bata, A. (2009). Decontamination of Mycotoxin-Containing Food and Feed by Biodegradation. *Food Reviews International*, 25.284-298
- Halloy, J., Gustin, P.J., Bouhet, S., Oswald, I.P. (2005). Oral exposure to culture material extract containing fumonisins predisposes swine to the development of pneumonitis caused by *Pasteurella multocida*. *Toxicology*, 213, 34-44.
- Hamilton, P.B. (1989). Determining safe levels of mycotoxins. *J Food Protection* 45, 570-575.
- Harvey, R.B., Huff, L.F., Kubena, L.F., Corrier, D.E., Philipps, T.D. (1988) Progression of aflatoxicosis in growing barrows. *Am J Vet Res* 49, 482-487.

- Harvey, R.B., Huff, W. E., Kubena, L.F., Phillips, T.D. (1989). Evaluation of diets contaminated with aflatoxin and ochratoxin fed to growing pigs. *Am J Vet Res*, 50, 1400-1405.
- Harvey, R. B., Edrington, T. S., Kubena, L. F., Elissalde, M. H., Rottinghaus, G. E. (1995b). Influence of aflatoxin and fumonisin B1-containing culture material on growing barrows. *Am J Vet Res.*56, 1668-1672.
- Harvey, R.B., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Corrier, D.E., Elissalde, M.H. (1995a). Influence of the antibiotics lincomycin and tylosin on aflatoxicosis when added to aflatoxin- contaminated diets of growing swine. *J. Vet. Diag. Invest.*7, 374-379.
- Harvey, R.B., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Elissalde, M.H., Casper, H.H., Rottinghaus, G.E. (1996). Effects of dietary fumonisin B<sub>1</sub>- containing culture materiel, deoxynivalenol- contaminated wheat, or their combination on growing barrows. *Am. J. Vet. Res.*, 57, 1790-1794.
- Hashmi, I., Pasha, T. N., Jabbar , M. A., Akram, M., and Hashmi A. S. (2006). Study of adsorption potential of yeast sludge against aflatoxins in broiler chicks. *J. Anim. Pl. Sci.* 16(1-2). 12-14.
- Hassan, A.M., Sheashaa, H.A., Abdel Fattah, M.F., Ibrahim, A.Z., Gaber, O.A., Sobh, M.A. (2006a). Study of ochratoxin A as an environmental risk that causes renal injury in breast-fed Egyptian infants. *PediatrNephrol.* 21,102-105.
- Hassan, A M., Sheashaa, H A., Abdel Fattah, MF., Ibrahim, AZ., Gaber, OA., Sobh, MA. (2006b). Does aflatoxin as an environmental mycotoxin adversely affect the renal and hepatic functions of Egyptian lactating mothers and their infants? A preliminary report. *Int Urol Nephrol.*38,339-342.
- Hassen, W., Ayed-Boussema, I., Azqueta Osoz, A., López de Cerain, A., Bacha, H .(2007). The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: Oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. *Toxicology*, 237, 294-302
- Hayasaka, I., i Hoshino, K., Kameyama, Y. (1986). Pathogenesis of Ochratoxin A- and Concanavalin A-Induced Exencephalies in Mice.Congenital Anomalies. 26(1), 11–24.
- Hayes, A. W., Hood, R. D., and Lee, H. L. (1974). Teratogenic effects of ochratoxin A in mice. *Teratology* 9, 93-97.
- Hayes, R.B., van Nieuwenhuize, J.P., Raatgever, J.W., and Ten Kate, F.J.W. (1984). Aflatoxin exposures in the industrial setting: An epidemiological study of mortality. *Food and Chemical Toxicology* 22(1),39-43.
- Hayes, J. D., and Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology.* 30, 445-600.
- Heflich, R. H., and Neft, R. E. (1994). Genetic toxicity of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene and some of their metabolites and model metabolites. *Mutation Research* 318, 73-114.
- Helferich, W.G., Garrett, W.N., Hsieh, D.P.H. & Baldwin, R.L. (1986a) Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *J. Anim. Sci.*, 62, 691-696
- Hemminki, K., Koskinen, M., Rajaniemi, H., and Zhao, C. (2000). DNA Adducts, Mutations, and Cancer Regulatory. *Toxicology and Pharmacology.* 32, 264-275.
- Hemminki, K., Thilly, W.G. (2004). Implication of results of molecular epidemiology on DNA adducts, their repair and mutations for mechanisms of human cancer, *IARC Sci. Publ.* 157, 217–235.
- Hennig, A., Fink-Gremmels, J., and Leistner, L. (1991). Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. *IARC Scientific Publications* 255-260.
- Henry, M. H., Wyatt, R. D., Fletcher, O. J. (2000). The Toxicity of Purified Fumonisin B1 in Broiler Chicks, *Poultry Science* 79:1378–1384.
- He, P., Young, L.G., Forsberg, C. (1993). Microbially detoxified vomitoxincontaminated corn for young pig. *J. Anim. Sci.*71, 963-967.
- Hicks, L.R., Brown, D.R., Storch, R.H., Bushway, R.J. (2000). Need to determine the relative developmental risks of Fusarium mycotoxin deoxynvalenol (DON) and benomyl (BEN) in wheat. *Hum. Ecol. Risk Assess.*6, 341-354.
- Hidy, P.H., Baldwin, R.S., Gresham, R.L., Keith, C.L., and Mc Mullen, J.R. (1977). Zearalenone and some derivatives : production and biological activities. *Adv. Appl. Microbiol.* 22, 59-82
- Hinchman, CA., & Ballatori, N. (1984). Glutathion conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. *J Toxic Health*, 41(4), 387-409.
- Hirota, M., Menta, A. B., Yoneyama, K., and Kitabatake, N. (2002). A major decomposition product, citrinin H2, from citrinin on heating with moisture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66, 206-210.
- Hoehler, D., R.R. Marquardt, A.R. McIntosh and H. Xiao. (1996). Free radical generation as induced by ochratoxin A and its analogs in bacteria (*Bacillus brevis* ). *J. of Bio. Chem.* 271:27388- 27394.
- Hoehler, D and Marquardt, R.R. (1996). Influence of vitamins E and C on the toxic effects of ochratoxin A and T-2 toxin in chicks. *Poult. Sci.* 75, 1508-1515.
- Hoehler, D., R.R. Marquardt and A.A. Frohlich. (1997). Lipid peroxidation as one mode of action in ochratoxin A toxicity in rats and chicks. *Canadian J. of Anim. Sci.* 77, 287-292.

- Hoerr, F.J., Carlton, W.W., Yagen, B., Joeff, A.Z. (1982). Mycotoxicosis produced in broiler chickens by multiple doses of eighter T-2 or diacetoxyscirpenol. *Avian Pathology*, 11, 369-383.
- Hogan, M. E., Dattagupta, N., and Whitlock, J. P., Jr. (1981). Carcinogen-induced alteration of DNA structure. *The Journal Of Biological Chemistry*. 256, 4504-4513.
- Hood, R. D., Kuczuk, M. H., and Szczech, G. M. (1978). Effects in mice of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and T-2 toxin. *Teratology* 17, 25-29.
- Hopmans, E., and Murphy, P.A. (1993). Detection of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub> and hydrolyzed fumonisin B<sub>1</sub> in corn-containing foods. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1655-1658.
- Hsia, CC., Wu, Z.Y., Li, Y.S., Zhang, F., Sun, Z.T. (2004). Nivalenol, a main Fusarium toxin in dietary foods from high-risk areas of cancer of esophagus and gastric cardia in China, induced benign and malignant tumors in mice. *Oncol Rep* 12, 449-456.
- Huff, W.E. and P.B Hamilton. (1975). Decreased plasma carotenoids during ochratoxicosis. *Poultry Sci.* 54:1308-1310.
- Huff, W.E and Doerr, J.A. (1981). Synergism Between Aflatoxin and Ochratoxin A in Broiler Chickens *Poult Sci.* 60, 550-555.
- Huff, W.E., Doerr J.A, Hamilton, P.B, Vesonder, R.F. (1981). Acute toxicity of vomitoxin (deoxynivalenol) in broiler-chickens. *Poult Sci.* 60, 1412-1414.
- Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D. (1992). Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. *Poult. Sci.* 71, 64-69.
- Hughes, DM., Gahl, M.J, Graham, C.H, Grieb, S.L. (1999). Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. *J Anim Sci.* 77, 693-700.
- Hult, K.A., Teiling, A., Gatenbeck, S. (1976). Degradation of Ochratoxin A by ruminants, *Applied And Environmental Microbiology* 32, 443-444.
- Hult, K., Hokby, E., Gatenbeck, S., and Rutqvist, L. (1980). Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Sweden: use in evaluation of toxin content of consumed feed. *Applied And Environmental Microbiology* 39, 828-830.
- Hult, K., Rutqvist, L., Holmberg, T., Thafvelin, B., and Gatenbeck, S. (1984). Ochratoxin A in blood of slaughter pigs. *Nordisk Veterinaermedicin* 36, 314-316.
- Hunter, J.A., Finkbeiner, W.E., Nadel, J.A., Goetzl, E.J., and Holtzman, M.J. (1985). Predominant generation of 15-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid by epithelial cells from human trachea. *82(14)* 4633-4637.
- Hurdey, S.E., Krewski, D. (1995). Is there a safe level of exposure to a carcinogen? *Environ. Sci. Technol.* 29, 370-375.
- Hurst, W.J., Snyder, K.P., and Martin, R.A. (1987). High-performance liquid chromatographic determination of the mycotoxins patulin, penicillic acid, zearalenone and sterigmatocystin in artificially contaminated cocoa beans. *Journal of Chromatography* 392, 389-396.
- Huwing, A., Freimund, S., Kappeli, O., and Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents, Swiss Federal Institute of Technology, Laboratory of Technical Chemistry, Universitatstrasse 6, 8092 Zurich, Switzerland, ABAC R & D Ltd, Strangenstrasse 1a, 8304 Wallisellen, Switzerland. *Toxicology Letters* 122, 179-188.
- Hwang, C-A., and Draughon, F.A. (1994). Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Food Protection* 57, 410-414.

## I

- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S., Comi, G. (2009). Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiology* 26, 65-70
- IARC (1987). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Supplement No. 7: Overall evaluation of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42, IARC, Lyon, 1987.
- IARC (1993). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Volume 31 : Some food additives, feed additives and naturally occurring substances. IARC, Lyon.
- IARC. (1993b). International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. 56, IARC, Lyon, 1993b
- IARC. (1993). Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> and fusarin C. in Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1993, 445-466.
- IARC (2002). International Agency for Research on Cancer, Lyon: Fumonisin B<sub>1</sub>. IARC, 2002.



- IARC (2002). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Volume 82: Some traditional herbal medicines, some Mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC, Lyon, France
- Iavicoli, I., Brera, C., Carelli, G., Caputi, R.M., Marinaccio, A., Miraglia, M. (2002). External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. *Int Arch Occup Environ Health*.75,381-386.
- Ibáñez-Vea, M., Martínez R., González-Peñas E., VLizarraga E, López de Cerain A. (2011). Co-occurrence of a.atoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from spanish market. *Food Control*. 22 1949-1955.
- Ibáñez-Vea, M., González-Peñas, E., Lizarraga, E., López de Cerain, A. (2012). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley from a northern region of Spain. *Food chemistry* 132(1), 35-42
- Igawa, T., Takahashi-Ando, N., Ochiai, N., Ohsato, S., Shimizu, T., Kudo, T., Yamaguchi, I., Kimura, M. (2007). Reduced Contamination by the Fusarium Mycotoxin Zearalenone in Maize Kernels through Genetic Modification with a Detoxification Gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 1622-1629.
- Il'ichev, Y. V., Perry, J. L., and Simon, J. D. (2002). Interaction of ochratoxin A with human serum albumin. Preferential binding of the dianion and the pH effects. *J.Phys.Chem.B* 106, 452-459.
- Imperato, R., Campone, L., Piccinelli, A L., Veneziano, A., Rastrelli, L. (2011).Survey of aatoxins and ochratoxin a contamination in food products Imported in Italy. *FoodControl*. 22(12), 1905-1910.
- Inoue, M., Okajima, K., Morino, Y. (1982). Metabolic coordination of liver and kidney in mercapturic acid biosynthesis in vivo. *Haptalogy*, 2(3) 311s-316s.
- Inoue, M., Okajima, K., Morino, Y. (1984). Hepato-Renal Cooperation in Biotransformation, Membrane Transport, and Elimination of Cysteine S-Conjugates of Xenobiotics, *J Biochem* 95(1) 247-254).
- INRA site internet. Les mycotoxines dans la chaîne alimentaire. [www.inra.fr/.../version/2/file/mycotoxines-cartels.pdf](http://www.inra.fr/.../version/2/file/mycotoxines-cartels.pdf) - 2011-02-11
- Ingerowski GH., Scheutwinkel-Reich M., Stan HJ. (1981). Mutagenicity studies on veterinary anabolic drugs with the Salmonella microsome test. *Mutat Res*, 91, 93-98.
- Ito, K., Suzuki, H., Hirohashi, T., Kume,K., Shimizu,T., Sugiyama,Y. (1998). Functional analysis of a canicular multispecific organic anion transporter cloned from rat liver. *Journal of biological chemistry*, 273, 1684-1688.
- Iverson, F., Armstrong, C., Nera, E., Truelove, J., Fernie, S., Scott, P., Stapley, R., Hay-ward, S., Gunner, S. (1995). Chronic feeding study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 15, 283-306.
- Izzotti, A., Neri, M., Vecchio,D., Puntoni, R. (1997). Molecular epidemiology in cancer research (review), *Int. J. Oncol*. 11, 1053–1069.

## J

- Jakoby, W. B., and Habig, W. H. (1980) Glutathione transferases. Zn WB Jakoby, ed, *Enzymatic Basis for Detoxification*. Academic Press , New York, 63-94
- Jard, G. (2009). Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales: Adsorption et Biotransformation. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., and Lebrihi, A. (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives and Contaminants* 28 (11), 1590–1609
- JECFA, WHO. (1999).Troisième conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUE sur les mycotoxines : Analyse des risques liés aux mycotoxines effectuée par le comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires; Tunis(Tunisie) 3-6 mars. MYC-CONF/99/7b, 1-28
- JECFA (2000). Zearalenone. In: joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Eds.), *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*. WHO/FAO Food Additives Series 44. IPCS-International Programme on Chemical Safety. WHO, Geneva.
- JECFA (2002). Evaluation of certain mycotoxins. fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 906.
- JECFA. (2007). (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives). Discussion paper on deoxynivalenol. 38<sup>th</sup> session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Beijing, China, 16-20 April 2007.
- Jeff-Agboola, YA., Onifade, AK., Akinyele, BJ., Osho, IB. (2011). Evaluation of consumption of aflatoxin contaminated feeds on hematological parameters of broilers. *Proceeding Mycored Africa*, conference, 4-6 April, Cape Town pp 90.
- Jelinsky, S. A., Liu, T., Geacintov, N. E., and Loechler, E. L. (1995). The major, N2-Gua adduct of the (+)-anti-benzo[a]pyrene diol epoxide is capable of inducing G-->A and G-->C, in addition to G-->T, mutations. *Biochemistry*. 34, 13545-13553.
- Jemmali, M. (1979). Decontamination and detoxification of mycotoxins, *Pure Applied Chem*. 52, 175-181.

- Jennings-Gee, JM., Tozlovanu, M., Manderville, R., Miller, MS., Pfohl-Leszkowicz, A., and Schwartz, GG. (2010). Ochratoxin A: In Utero Exposure in Mice Induces Adducts in testicular DNA. *Toxins*, 2, 1428-1444.
- Jeswal, P. (1995). Cumulative effect of ochratoxin A and citrinin on induction of hepatorenal carcinogenesis in mice (*Mus musculus*). *Biomedical Letters* 52, 269-275.
- Jeswal, P. (1996). Citrinin-induced chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of *Mus musculus*. *Cytobios*, 86, 329-331.
- Joannis-Cassan, C., Tozlovanu, M., Hadjeba-Medjoub, K., Ballet, N., and Pfohl-Leszkowicz, A. (2011). Binding of Zearalenone, Aflatoxin B<sub>1</sub>, and Ochratoxin A by Yeast-Based Products: A Method for Quantification of Adsorption Performance. *Journal of Food Protection*, 74(7), 1175–1185.
- Jørgensen, K. (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Addit. Contam* 5, 550-554.
- Jouany, J.P. (2011). Mieux comprendre le rumen, un fermenteur multi-tache très efficace. Jovanovic, S.V., Hara, Y., Steenken, S., Simic, M.G. (1997). Antioxidant potential of gallic catechins. A pulse radiolysis and laser photolysis study. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5337-5343.
- Juan, C., Pena, A., Lino, C., Moltó, J.C., Mañes, J. (2008). Levels of ochratoxin A in wheat and maize bread from the central zone of Portugal. *International Journal of Food Microbiology*. 127(3), 284-289.
- Jung, K. Y., Takeda, M., Kim, D. K., Tojo, A., Narikawa, S., Yoo, B. S., Hosoyamada, M., Cha, S. H., Sekine, T., and Endou, H. (2001). Characterisation of ochratoxin A transport by human organic anion transporters. *Life Sciences*. 69, 2123-2135.
- Juniper, D.T., Phipps, R.H., Givens, D.I., Jones, A.K., Green, C and Bertin, G. (2008). Tolerance of ruminant animals to high dose in-feed administration of a selenium-enriched yeast. *J Anim Sci* .86, 197-204.
- Jurjević, Ž., Solfrizzo, M., Cvjetković, B., Avantaggiato, G., Visconti, A. (1999). Ochratoxin A and fumonisins (B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>) in maize from Balkan nephropathy endemic and non endemic areas of Croatia. *Mycotoxins Res* 15, 67-80.

## K

- Kabab, B., Dobson, A.D.W., Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed : A review Critical reviews in food and nutrition . 46(8), 593-619.
- Kabab, B. (2010). Chapter 13 Prevention and Management of Mycotoxins in Food and Feed. M. Rai and A. Varma (eds.), *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010
- Kand, Y.J., and Alexander, J.M. (1996). Alterations of the glutathione redox cycle status in fumonisin B<sub>1</sub>-treated pig kidney cells. *Journal of Biochemical Toxicology* 11(3), 121-126.
- Takeya, H., Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Onose, R., Yamaguchi, I., Osada, H. (2002). Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non-estrogenic compound by a fungal strain of *Clonostachys* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 2723-2726.
- Kamimura, H. (1986). Conversion of zearalenone to zearalenone glycoside by *Rhizopus* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 515-519.
- Kamp, H.G., Eisenbrand, G., Schlatter, J., Würth, K., Janzowski, C. (2005). Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. *Toxicology*. 206, 413-425
- Kane, A., Creppy, E. E., Rosenthaler, R., and Dirheimer, G. (1986a). Changes in urinary and renal tubular enzymes caused by subchronic administration of ochratoxin A in rats. *Toxicology* 42, 233-243.
- Kanisawa, M., and Suzuki, H. (1975). Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann*. 69, 599-600.
- Kanisawa, M. (1984). Pathogenesis of human cancer development due to environmental factors. *Gan No Rinsho. Japan Journal Of Cancer Clinics*. 30, 1445-1456.
- Karaman, M., Basmacioglu, H., Ortatli, M., Oguz, H. (2005). Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. *British Poultry Science* 45(3), 394-400.
- Karlovsky, P. (1999). Review Biological Detoxification of Fungal Toxins and its Use in Plant Breeding, Feed and Food Production. *Nat. Toxins* 7, 1-23.
- Karlovsky, P., Edmund III Crane, H., Gilliam, J. T., Maddox, J. R. (2003). Compositions and methods of zearalenone detoxification. US patent 20030073239, Pioneer Hi-Bred International, Inc. (Des Moines, IA).
- Keese, C., Meyer, U., Valenta, H., Schollenberger, M., Starke, A., Weber, I.A., Rehage, J., Breves, G., Danicke, S. (2008). No carry over of unmetabolised deoxynivalenol in milk of dairy cows fed high concentrate proportions. *Mol Nutr Food Res*. 52, 1514-1529.



- Kerkadi, A., Barriault, C., Tuchweber, B. (1998). Dietary cholestyramine reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in the rat by decreasing plasma levels and enhancing fecal excretion of the toxin. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 53, 231–250.
- Ketterer, B., Meyer, D.J., Taylor, J.B., Pemble, S., Coles, B., and Fraser, G. (1990). GSTs and protection against oxidative stress. In: *Glutathione-S-transferases and drug resistance* (Hayes J.D., Pickett C.B. and Mantle T.J., Eds) Taylor and Francis, London 97-109.
- Khan, K.N., Knapp, D.W., Denicola, D.B., and Harris, R.K. (2000). Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *American Journal Of Veterinary Research* 61, 478-481.
- Khera, K.S., Whalen, C., Angers, G., Vesonder, R.F., Kuipergoodman, T. (1982). Embryotoxicity of 4-deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 487-491.
- Khera, K.S., Aarnold, D.L., Whalen, C., Angers, G., Scott, P.M. (1984). Vomitoxin (4 deoxynivalenol): effects on reproduction of mice and rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74, 345-356.
- Kiessling, K.H., Pettersson, H., Sandholm, K., Olsen, M. (1984). Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1070-1073.
- Kim, Y.Y., Mahan, D.C. (2001). Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs. *J Anim. Sci.* 79, 942-948.
- Kitchen, D.N., Carlton, W.W., Tuite, J. (1977). Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs. *Pathology. Vet. Pathol*, 14, 154-172.
- Klarić, M.S., Rumora, L., Ljubanović, D., Pepelnjak, S. (2008). Cytotoxicity and apoptosis induced by fumonisin B<sub>1</sub>, beauvericin and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment. *Arch Toxicol.* 82, 247–255.
- Knecht, A., Schwerdt, G., Gekle, M., Humpf, H-U. (2005). Combinatory effects of citrinin and ochratoxin A in immortalized human proximal tubule cells. *Mycotoxin Research*. 21(3), 176-181.
- Kollarezik, B., Gareis, M., Hanelt, M. (1994). In vitro transformation of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. *Nat Toxins*. 2(3):105–110.
- Kolosova, A., and Stroka, J. (2011). Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxins: a review. World Mycotoxin Journal* 4(3), 225-256.
- Kouadio, J.H., Mobio, T.H., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S.D., Creppy, E.E. (2005). Comparative study of cytotoxicity and oxidative Stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B<sub>1</sub> in Human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*. 213, 56-65.
- Kouadio, J.H., Dano, S.D., Mobio, T.A., Creppy, E.E. (2007). Effects of combination of *Fusarium* mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA, methylation and fragmentation, and ability in Caco2 cells. *Toxicol.* 19, 306-317.
- Koyama, H., Goodpasture, C., Miller, M.M., Teplitz, R.L. and Riggs, A.D. (1978). Establishment and characterization of a cell line from the American opossum (*Didelphys virginiana*). *In vitro*. 14, 239-246.
- Koynarski, V., Stoev, S., Grozeva, N., Mirtcheva, T., Daskalov, H., Mitev, J., Mantle P. (2007). Experimental coccidiosis provoked by *Eimeria acervulina* in chicks simultaneously fed on ochratoxin A contaminated diet. *Research in Veterinary Science*. 82, 225–231.
- Kozack, R., Seo, K. Y., Jelinsky, S. A., and Loechler, E. L. (2000). Toward an understanding of the role of DNA adduct conformation in defining mutagenic mechanism based on studies of the major adduct (formed at N2-dG) of the potent environmental carcinogen, benzo[a]pyrene. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 450, 41-59.
- Krejci, M. E., Bretz, N. S., and Koechel, D. A. (1996). Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in potassium plasma. *Toxicology* 106, 167-177.
- Krogh, P., and Hasselager, E. (1968). Studies on fungal nephrotoxicity. *Year book R. Vet. Agric. Coll. Copenhagen*. pp. 198-214.
- Krogh, P. (1972). Mycotoxic porcine nephropathy: a possible model for Balkan Endemic nephropathy. In: *Pulchev, Dinev, Milev, Doichinov. Eds Endemic Nephropathy*, Sofia, Bulgarian Academy of science 266-270.
- Krogh, P., Axelsen, N. H., Elling, F., Gyrd-Hansen, N., Hald, B., Hyldgaard-Jensen, J., Larsen, A. E., Madsen, A., Mortensen, H. P., and Moller et al. (1974). Experimental porcine nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A- contaminated feed. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology* 246, 1-21.
- Krogh, P., Elling, F., Friis, C., Hald, B. et al. (1979). Porcine nephropathy induced by long-term ingestion of ochratoxin A. *Vet. Pathol.* 16, 466–475.
- Kryptopoulos, S.A. (2006). Biomarkers in environmental carcinogenesis research: striving for a new momentum. *Toxicol. Lett.* 162, 3–15.
- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Huff, W.E. (1988). Modulation of aflatoxicosis in growing chickens

- by dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poult. Sci.* 67 (Suppl. 1), 106.
- Kubena, L.F., Huff, W.E., Harvey, R.B., Yersin, A.G., Elissalde, M.H., Witzel, D.A., Giroir, L.E., Phillips, T.D., Petersen, H.D. (1991). Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicates on growing turkey poult during aflatoxicosis. *Poult. Sci.* 70, 1823–1830.
- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Clement, B.A. (1993b). Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicates on aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.* 72, 651–657.
- Kubena, L.F., Edrington, T.S., Kamps-holtzapple, C., Harvey, R.B., Elissalde, M.H., Rottinghaus, G.E. (1995). Influence of fumonisin B<sub>1</sub> present in *Fusarium moniliforme* culture material, and T-2 toxin on turkey poult. *Poult. Sci.* 74, 306–313.
- Kubena, L.F., Edrington, T.S., Harvey, R.B., Buckley, S.A., Phillips, T.D., Rottinghaus, G.E., Casper, H.H. (1997a). Individual and combined effect of fumonisin B<sub>1</sub> present in *Fusarium moniliforme* culture material and T-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. *Poult. Sci.* 76, 1239–1247. 264.
- Kuciel-Lisieska, G., Obremski, K., Stelmachow J., Gajecka, M., Zielonka, Ł., Jakimiuk, E., Gajecki, M. (2008). The presence of zearalenone in blood plasma in women with neoplastic lesions in a mammary gland. *Bull Vet Inst Pulawy.* 52, 671– 674.
- Kuiper-Goodman, T., Hilt, C., Billiard S.M., Kiparissis, Y., Richard, I.D.K., and Hayward, S. (2010). Health risk assessment of ochratoxin A for all age-sex strata in a market economy. *Food Additives and Contaminants.* 27(2), 212–240.
- Kulkarni, A.P., and Sajan, M. (1999). Lipoygenase-another pathway for glutathione conjugation of xenobiotics: A study with human term placental lipoygenase and ethacrynic acid. *Archives Of Biochemistry And Biophysics.* 371, 220–227.
- Kumar, M., Dwivedi, P., Sharma, A.K., Singh, N.D., and Patil, R.D. (2007). Ochratoxin A and citrinin nephrotoxicity in New Zealand White rabbits: a ultrastructural assessment. *Mycopathologia.* 163, 21–30.
- Kushiro M. (2008). Effects of Milling and Cooking Processes on the Deoxynivalenol Content in Wheat. *Int J Mol Sci.* 9, 2127–2145.
- Kusumaningtyas, E., Widiastuti, R., and Maryam, R. (2006). Reduction of aflatoxin B<sub>1</sub> in chicken feed by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* and their combination. *Mycopathologia.* 162. 307–311.

## L

- Lafleur, M.V.M., and Retèl, J. (1993). Contrasting effects of SH-compounds on oxidative DNA damage: repair and increase of damage. *Mutation Research/DNAging* 295(1), 1–10.
- Larsen, J.C., Hunt, J., Perrin I., Ruckebauer, P. (2004). Workshop on trichothecenes with a focus on DON :summary report. *Toxicol. Lett.* 153, 1–22. 27, 383–394.
- Lebreton, P., Dalat, O., and Nicol, J.M. (1998). Un point sur le sélénium. *Bull. Group. Tech. Vét.* (5), 35–47.
- Lebrun, S., and Follmann, W. (2002). Detection of ochratoxin A-induced DNA damage in MDCK cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *Archives of Toxicology* 75, 734–741.
- Ledoux, D.R., Brown, T.P., Weibking, T.S. & Rottinghaus, G.E. (1992). *Fusarium* toxicity in broiler chicks. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4, 330–333.
- Ledoux, D.R., Broomhead, J.N., Bermudez, A.J., and Rottinghaus, G.E. (2003). Individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins fumonisin B<sub>1</sub> and moniliformin in broiler chicks. *Avian Dis* 47, 1368–1375.
- Leier, I., Hummel-Eisenbeiss, J., Cui, Y., Keppler, D. (2000). ATP dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. *Kidney international*, 57, 1636–1642. Lemmer, E.R., Vessey, C.J., Gelderblom, W.C.A., Shephard, E.G., Van Schalkwyk, D.J., Rochelle, D.J.,
- Lemmer, E.R., Vessey, C.J., Gelderblom, W.C.A., Shephard, E.G., Van Schalkwyk, D.J., Van Wijk, R.A., Marasas, W.F.O., Kirsch, R.E., Hall, P.M. (2004). Fumonisin B<sub>1</sub>-induced hepatocellular and cholangiocellular tumors in male Fischer 344 rats: potentiating effects of 2-acetylaminofluorene on oval cell proliferation and neoplastic development in a discontinued feeding study. *Carcinogenesis*. 25 (7), 1257–1264.
- Leoni, L. A. B., Valente Soares, L. M., and Oliveira, P. L. C. (2000). Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees, *Food Addit. Contam.* 17, 867–870.
- Levenson, A.S. (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*, 57, 3071–3078.
- Lindemann, M.D., Blodgett, D.J., Kornegay, E.T., Schurig, G.G., (1993). Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanling/ growing swine. *J. Anim. Sci.* 71, 171–178.
- Li, D., Wang, Y.M., Nath, R.G., Mistry, S., Randerath, K. (1991). Modulation by dietary Vitamin E of I-compounds (putative indigenous DNA modifications) in rat liver and kidney, *J. Nutr.* 12, 65–71.
- Li, S., Marquardt, A., Frohlich, A., Vitti, T.G. & Crow, G. (1997). Pharmacokinetics of ochratoxin A and its

- metabolites in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 145, 82-90.
- Li, S., Marquardt, R., and Frohlich, A.A. (1998). Confirmation of ochratoxins in biological samples by conversion into methyl esters in acidified methanol. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46, 4307-4312.
- Li, Y.C., Ledoux, DR., Bermudez, A.J., Fritsche, K.L., Rottinghaus, GE. (1999). Effect of fumonisin B<sub>1</sub> on selected immune response in broiler chicks. *Poultry Sci*, 78:1275-82.
- Limp-Foster, M., and Kelley, M. R. (2000). DNA repair and gene therapy: implications for translational uses. *Environmental And Molecular Mutagenesis* 35, 71-81.
- Linn, J.L, and Chapman, B. (2002). Drough feed concerns and feeding strategies. *Timely Topics*, October 2002.
- Lioi, M. B., Santoro, A., Barbieri, R., Salzano, S. and Ursini, M.V. (2004). Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 557(1), 19-27.
- Little, C.J., McNeil, P.E., Robb, J.(1991). Hepatopathy and dermatitis in a dog associated with the ingestion of mycotoxins. *J. Small Anim. Pract* 32, 23-26.
- Liu, L., Daniels, J.M., Stewart, R.K., Massey, T.E. (1990). In vitro prostaglandin H synthase and monooxygenase mediated binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to DNA in guinea pig tissue microsomes. *Carcinogenesis* 11(11), 1915-1919.
- Liu, L., Nakatsu, K., Massey, T.E. (1993). In vitro cytochrome P450 monooxygenase and prostaglandin H-synthase mediated aflatoxin B<sub>1</sub> biotransformation in guinea pig tissues: Effects of  $\beta$ -naphthoflavone treatment. *Archives of Toxicology* 67(6), 379-385.
- Liu, L., and Massey, T.E. (1992). Bioactivation of aflatoxin B<sub>1</sub> by lipoxygenases, prostaglandin H synthase and cytochrome P450 monooxygenase in guinea-pig tissues. *carcinogenesis* 13, 533-539.
- Liu, J., Yang, C.F., Lee, B.L., Shen, H.M., Ang S.G., and Ong. C.N. (1999). Effect of *Salvia miltiorrhiza* on aflatoxin B<sub>1</sub>-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Free Radical Res.* 31:559-568.
- Liu, B.H., Yu, F.Y., Wu, T.S., Li, S.Y., Su, M.C., Wang, M.C., and Shih, S.M. (2003). Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 191, 255-263.
- Lizardo, R., Perez-Vendrell, A., Ballet, N., Auclair, E., and Brufau, O. (2009). Influence de la source et du niveau de sélénium des régimes sur les performances zootechniques et sur la teneur en sélénium de la viande chez le porc. *Journée de Recherche Porcine*, 41, 1-x.
- Loechler, E. L. (1996). The role of adduct site-specific mutagenesis in understanding how carcinogen-DNA adducts cause mutations: perspective, prospects and problems. *carcinogenesis* 17, 895-902.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., and Perone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur J Plant Pathol* 109, 645-667.
- Lombaert, G.A., Pellaers, P., Chettiar, M., Lavalee, D., Scott, P.M., and Lau, B.P.Y. (2002). Survey of Canadian retail coffees for ochratoxin A. *food additives and contaminants* 19(9), 869-877.
- Lotlikar, P.D., Jhee, E.C., Insetta, S.M., and Clearfield, M.S. (1984). Modulation of microsome-mediated aflatoxin B<sub>1</sub> binding to exogenous and endogenous DNA by cytosolic glutathione S-transferases in rat and hamster livers. *Carcinogenesis* 5 (2), 269-276.
- Loveless, A. (1969). Possible relevance of O<sup>6</sup>-alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines. *Nature* 223, 206-207.
- Lovell, M.A., Xiong, S., Lyubartseva, G., and Markesbery, W.R. (2009). Organoselenium (Sel-Plex diet) decreases amyloid burden and RNA and DNA oxidative damage in APP/PS1 mice. *Free Radic Biol Med.* 1, 46(11), 1527-33.
- Lubulwa, A.S.G., and Davis, J.S. (1994) Estimating the social costs of the impacts of fungi and aflatoxins in maize and peanuts. In "Stored-product Protection". E. Highley, E.J. Wright, H.J. Banks and B.R. Champ (Eds) CAB international. UK: 1017-1042
- Luch, A. (2005). Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nature Reviews.Cancer* 5, 113-125.
- Lusky, K., Tesch, D., Gobel, R., (1995) Untersuchung der Wirkung von natürlichem und kristalinem Ochratoxin A nach Verfütterung über 28 Tage beim Schwein mit anschließender Untersuchung des Rückstandsverhaltens beider Formen des Mykotoxins in Körperflüssigkeit und Organen sowie in Fleisch und Wurstwaren. *Arch Lebensmittelhyg.* 46, 45-48.
- Luu-The, V., Bernier, F., Dufort, I. 1996. Steroid sulfotransferases. *J. Endocrinol.*, 150, S87-97.
- Lynch, G.P., Todd, G.C., Shalkop, W.T. & Moore, L.A. (1970) Response of dairy calves to aflatoxin contaminated feed. *J. Dairy Sci.*, 53, 63-68
- Lynch, G.P., Covey, F.C., Smith, D.F. & Weinland, B.T. (1972) Response of calves to a single dose of aflatoxin. *J. animal Sci.*, 35, 65-69.

## M

- Maaroufi K, Achour A, Betbeder AM, Hammami M, Ellouz F, Creppy EE et Bacha H (1995). Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: A correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Arch Toxicol*, 69, 552-558.
- Madhyastha, M. S., Frohlich, A. A., and Marquardt, R. R. 1992. Effect of dietary cholestyramine on the elimination pattern of ochratoxin A in rats. *Food Chem. Toxicol.* 30, 709–714.
- Madhyastha MS, Marquardt RR, Abramson D. (1994) Structure-activity-relationships and interactions among trichothecene mycotoxins as assessed by yeast bioassay. *Toxicon* 32, 1147-1152.
- MAFF. (1996). Surveillance of ochratoxine A in green (unroasted) coffee beans. Food surveillance information sheet N°80. Food safety directorate.
- Mahan, DC. (2000).Effect of organic and inorganic selenium sources and levels on sow colostrum and milk selenium content., *J ANIM SCI*, 78,100-105
- Mahdavi, R., Nikniaz, L., Arefhosseini, S.R., Vahed Jabbari, M.(2010). Determination of Aflatoxin M1 in Breast Milk Samples inTabriz-Iran. *Matern Child Health J* (2010)14, 141-145.
- Mahfoud, R., Maresca, M., Santelli, M., Pfohl-Leszkowicz, A, Puigserver, A. & Fantini, J. (2002). PH-dependent interaction of fumonisin B1 with cholesterol:physico-chemical and molecular modeling studies at the air-water interface *J.Agric Food*, 50 (2), 327-331.
- Maia, PP., and Pereira ME Bastos de Siqueira. (2002). Occurrence of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in some Brazilian pet foods, *Food Addit. Contam*, 19, 1180–1183
- Majima, M., Amano, H., and Hayashi, I. (2003). Prostanoid receptor signaling relevant to tumor growth and angiogenesis. *Trends In Pharmacological Sciences* 24, 524-529.
- Malaveille, C., Brun, G., and Bartsch, H. (1991). Genotoxicity of ochratoxin A and structurally related Advances in Molecular Toxicology. 1, compounds in *Escherichia coli* strains: studies on their mode of action. IARC Scientific Publications 261-266.
- Malaveille, C., Brun, G., and Bartsch, H. (1994). Structure-activity studies in *E. coli* strains on ochratoxin A (OTA) and its analogues implicate a genotoxic free radical and a cytotoxic thiol derivative as reactive metabolites. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 307, 141-147.
- Malekinejad, H., Mirzakhani, N., Razi, M., Cheraghi, H., Alizadeh, A., Darmeh, F. (2011). Protective effects of melatonin and *Glycyrrhiza glabra* extract on ochratoxin A--induced damages on testes in mature rats. *Hum Exp Toxicol*, 30(2) 113-123.
- Malstrom, K., Stange, G., and Murer, H. (1987). Identification of proximal tubular transport functions in the established kidney cell line, OK. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 902, 269-277.
- Manderville R a and Pfohl-Leszkowicz A. (2006). Chapter 4 Genotoxicity of Chlorophenols and Ochratoxin A. 2006, 85-138
- Manderville R a and Pfohl-Leszkowicz A.(2008). Bioactivation and DNA adduction as a rationale for ochratoxin A carcinogenesis. *World Mycotoxin Journal*, 1(3): 357-367
- Manning, R. O.; Wyatt, D., 1984, Toxicity of *Aspergillus ochraceus* contaminated wheat and different chemical forms of ochratoxin A in broiler chicks. *Poultry Sci.* 63(3), 458-465.
- Manolova, Y., Manolov, G., Parvanova, L., Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., and Chernozemsky, I. N. (1990). Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly X-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, A mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 231, 143-149.
- Monroe, D.H., and Eaton, D.L. (1987). Comparative effects of butylated hydroxyanisole on hepatic in vivo DNA binding and in vitro biotransformation of aflatoxin B<sub>1</sub> in the rat and mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology* 90(3), 401-409
- Monroe, D.H., and Eaton, D.L. (1988). Effects of modulation of hepatic glutathione on biotransformation and covalent binding of aflatoxin B1 to DNA in the mouse. *Toxicology and applied pharmacology* 94(1), 118-127.
- Manthey FA, Wolf-Hall CE, Yalla S, Vijayakumar C, Carlson D. (2004). Microbial loads, mycotoxins, and quality of durum wheat from the 2001 harvest of the Northern Plains region of the United States. *J Food Prot* 67: 772b780.
- Mantle, P., Kulinskaya, E., Nestler, S., (2005) Renal tumorigenesis in male rats in response to chronic dietary ochratoxin A, *Food Addit. Contam., Suppl.* 1, 58 –64.
- Mantle, P.G., Faucet-Marquis, V., Manderville,R., Squillaci, B ., and Pfohl-Leszkowicz, A. (2010). Structures of covalent adducts between DNA and ochratoxin A : anew factor in debate about genotoxicity and human risk assessment. *Chem., Res, Toxicol* 23(1), 89-98.
- Marasas, W.F.O., Jaskiewicz, K, Venter, F.S. & van Schalkwyk, D.J. (1988a) *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *S. Afr. med. J.*, 74, 110-114

- Marasas, W.F., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C., Coetzer, J.A., Thiel, P.G., and Van Der Lugt, J.J. (1988b). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B<sub>1</sub> isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res* 55, 197-203.
- Maresca, M., Mahfoud, R., Garmy, N., Fantini, J. (2002). The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. *J. Nutr.*, 132, 2723-2731.
- Marijanovic, D.R., Holt, P., Norred, W.P., Bacon, C.W., Voss, K.A. & Stancel, P.C. (1991) Immunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. *Poultry Sci.*, 70, 1895-1901.
- Marin, D.E., Gouze, M.E., Taranu, I., Oswald, I.P. (2007). Fumonisin B<sub>1</sub> alters cell proliferation and IL2 synthesis in swine peripheral blood mononuclear cells. *Mol. Nutr. Food Res*, 51(11)1406-1412.
- Marin, D.E., Taranu, I., Burlacu, R., Manda, G., Motiu, M., Neagoe, I., Dragomir, C., Stancu, M., Calin, L. (2011). Effects of zearalenone and its derivatives on porcine immune response. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 1981-1988
- Markovic, B. (1985). Néphropathie des Balkans et carcinomes à cellules transitionnelles. *Journal d'Urologie* 91, 215-220.
- Marnett, L.J., and Eing, T.E. (1983). Cooxidation during prostaglandin biosynthesis: a pathway for the metabolic activation of xenobiotics- review. *Biochemical toxicology*
- Marpegan, M.R., Perfumo, C.J., Godoy, H.M., Sala de Miguel, M., Diaz, E. and Risso, M.A. (1988). Feed refusal of pigs caused by *Fusarium* mycotoxins in Argentina. *Zentralbl. Veterinarmed. A*, 35(8): 610-6.
- Martin, W., Lorkowski, G., Creppy, E.-E., and Dirheimer, G. (1986). Action of citrinin on bacterial chromosomal and plasmid DNA in vivo and in vitro. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 1273-1279
- Martins, M.L., Gimeno, A., Martins, H.M., and Bernardo, F. (2002). Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Foodaddit.Contam.*19, 568-574.
- Martins, M.L., Martins, H.M and Bernardo, F. (2003). Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food, *Rev. Port. Ciênc. Vet* 98, 179-183.
- Massart, F., & Saggese, G. (2010). Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. *International journal of andrology*, 33, 369-376.
- Massart, F., Meucci V., Saggese G., Soldani, G. (2008). High Growth Rate of Girls with Precocious Puberty Exposed to Estrogenic Mycotoxins *The journal of Pediatrics*, 152(5) 690-695.
- Mayura, K., Edwards, J.F, Maull, E.A. and Phillips, T.D. (1986). The effects of ochratoxin A on postimplantation rat embryo limb buds. *Toxicol. Lett.* 54, 129-134.
- McKean, C., Tang, L., Tang, M., Billam, M., Wang, Z., Theodorakis, C.W., Kendall, R.J., Wang, J-S.(2006). Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> in animals and human cells. *Food and Chemical Toxicology*. 44(6), 868-876.
- McLeod, R., Ellis, E.M., Arthur, J.R., Neal, G.E., Judah, D.J., Manson, M.M., Hayes, J.D. (1997). Protection conferred by selenium deficiency against aflatoxin B<sub>1</sub> in the rat is associated with the hepatic expression of an aldo-keto reductase and a glutathione S-transferase subunit that metabolize the mycotoxin. *Cancer research* 57, 4257-4266.
- Meca, G., Blaiotta, G., and Ritieni, A. (2010). Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control* 21, 579-583.
- McMullen, J.R. (1977). Microbiological reduction of zearalenone and related compounds. US patent 4,004,978, IMC Chemical Group, Inc. (Terre Haute, IN).
- Megharaj, M., Garthwaite, I., Thiele, J. H. (1997). Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 329-333.
- Meki A.R., S.K. Abdel-Ghaffar and I. El-Gibaly. (2001). Aflatoxin B<sub>1</sub> induces apoptosis in rat liver: protective effect of melatonin. *Neuroendocrinol. Letter* 22, 417-426.
- Meky, F.A., Turner, P.C., Ashcroft, A.E., Miller, J.D., Qiao, Y.L., Roth, M.J. and Wild, C.P. (2003). Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol. *Food. Chem. Toxicol.*, 41(2), 265-73.
- Meissonnier., Oswald, I.P., Galtier P. (2005). Aflatoxicoses chez le porc - Étude bibliographique de données cliniques et expérimentales. *Revue Méd. Vét.*, 156, 12, 591-605
- Meucci, V., Soldani, G., Razzuoli, E., Saggese, G., Massart, F. (2011) .Mycotoxin pollution of Italian infant Food. *The Journal of Pediatrics* (in press)
- Mezes, M., M. Barta and G. Nagy. (1999). Comparative investigation on the effect of T-2 mycotoxin on lipid peroxidation and antioxidant status in different poultry species. *Res. in Vet. Sci.* 66.19-23.
- Micco, C., Miraglia, M., Onori, R., Ioppolo, A., and Mantovani, A. (1987). Long-term administration of low doses of mycotoxins in poultry.1. Residues of Ochratoxin A in broilers and laying hens, *Poultry Sci.* 66, 47-50.
- Micco, C., Grossi, M., Miraglia, M., and Brera, C. (1989). A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans, *Food additives and Contaminants* 6, 333-339.

- Micco, C., Ambrozzi, A., Miraglia, M., Brera, C., Onori, R., and Benelli, L. (1991a). Contamination of human milk with ochratoxin A. *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary tract tumors*, edited by P. R. Castegnaro, R. Plestina, M. Dirheimer, G., Chernozemsky and I. N. Bartsch, IARC Scientific Publications N° 115 (Lyon: IARC), 105-108.
- Micco, C., Miraglia, M., Onori, R., Libanori, A., Brera, C., Mantovani, A., Macri, C. (1991b). Effect of combined exposure to ochratoxin A and penicillic acid on residues and toxicity in broilers. *LaRavista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione* 20(3), 101-108
- Micco, C., Miraglia, M., Brera, C., Corneli, S., and Ambrozzi, A. (1995). Evaluation of Ochratoxin A in human milk in Italy, *Food Additives and Contaminants* 12, 351-354.
- Migdalof, BH., Dugger, HA., Heider, JG., Coombs, RA., Terry, MK.. (1983). Biotransformation of zearanol: disposition and metabolism in the female rat, rabbit dog, monkey and man. *Xenobiotica* 13(4), 209-221.
- Miller, E. C., and Miller, J. A. (1981). Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer* 47, 2327-2345.
- Miller, M. S., McCarver, D. G., Bell, D. A., Eaton, D. L., and Goldstein, J. A. (1997). Genetic polymorphisms in human drug metabolic enzymes. *Fundamental And Applied Toxicology: Official Journal Of The Society Of Toxicology* 40, 1-14.
- Miller, DL. (1998). Global significance of mycotoxins: Mycotoxins and Phycotoxins *Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*, Ed° M. Miraglia, H. Van Egmond, C. Brera, and J. Gilbert. USA, 3- 15.
- Minervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A., and Visconti, A. (2005). Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicology Letters* 159(3), 272-283
- Miraglia, M., Brera, C., Corneli, S., and De Dominicis, A. (1993). Ochratoxin A in Italy: status of knowledge and perspectives. In "Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G (Eds)" *Human ochratoxicosis and its pathologies*. 231. Colloque INSERM / John Libbey Eurotext, 129-139.
- Miraglia, M., De Dominicis, A., Brera, C., Corneli, S., Cava, E., Menghetti, E., and Miraglia, E. (1995). Ochratoxin A levels in human milk and related food samples: an exposure assessment, *Nat. Toxins* 3, 436-444.
- Miraglia, M., and Brera, C. (2000). Mycotoxins in Grains and Related Products.. In "Food Analysis by HPLC". Leo ML Nollet 2 nd eds. Marcel Dekker, Inc. New York. Chapter n° 12. 493-522.
- Mirocha, C. J., Christensen C. M., Nelson G. H. (1968). Toxic metabolites produced by fungi implicated in mycotoxicoses, *Biotechnology and Bioengineering*, 10 (4), 469-482
- Mirocha, C.J., Pathre, S.V. & Robison, T.S. (1981). Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet. Toxicol.*, 19, 25-30.
- Mitchell, D.L., Haipek, C.A., Clarkson, J.M. (1985). (6-4)Photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutation Research Letters* 143(3). 109-112.
- Molinié, A. (2004 thèse). Qualité sanitaire des blés en région Midi-pyrénées: suivi du taux de contamination en mycotoxines (ochratoxine A et citrinine). Etude des effets biologiques de l'exposition à ces deux toxines. thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse 231p.
- Molinié, A., Faucet V., Castegnaro, M. & Pfohl-Leskowicz, A. (2005). Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in ochratoxin A, citrinin and fumonisin B<sub>1</sub>. Development of a new method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry*. 92, 391-400
- Moller, P., and Wallin, H. (1998). Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutation Research* 410, 271-290.
- Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E. and Prillinger, H. (2004). *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 661-671.
- Monks, T.J., Lau, S.S. (1987). Commentary: renal transport processes and glutathione conjugate-mediated nephrotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* 15, 437-441.
- Monks, T. J., Anders, M. W., Dekant, W., Stevens, J. L., Lau, S. S., and van Bladeren, P. J. (1990). Glutathione conjugate mediated toxicities. *Toxicology and Applied Pharmacology* 106, 1-19.
- Moore, C.J., Blaney, B.J., Spencer, R.A. and Dodman, R.L. (1985). Rejection by pigs of mouldy grain containing deoxynivalenol. *Aust. Vet. J.*, 62(2): 60-2.
- Moré, J., and Galtier, P. (1974). Toxicité de l'ochratoxine A. I: Effet embryotoxique et tératogène chez le rat. *Ann. Rech. Vet.* 5, 167-178.
- Moré, J., and Galtier, P. (1975). Toxicité de l'ochratoxine A. II: Effets du traitement sur la descendance (F1 et F2) des rates intoxiquées. *Ann. Rech. Vet.* 6, 379-389.

- Mori, H., kawai, K., Bayashi, F., kuniyasu, T., Hamazaki, T., and Williams, G. M. (1984). Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture/DNA repair test using rat and mouse hepatocytes. *Cancer Res.* 44, 2918-2923.
- Morooka, N., Uratsuji, N., Yoshizawa, T. and Yamamoto, H. (1972). Studies on the substances in barley infected with *Fusarium* spp. *Jpn J. Food Hyg.*, 13: 368-375.
- Morrissey, R.E. and Vesonder, R.F. (1985). Effect of deoxynivalenol (vomitoxin) on fertility, pregnancy, and postnatal development of Sprague-Dawley rats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49(5), 1062-6.
- Mortensen, G.K., Strobel, BW., Hansen, HCB. (2006). Degradation of zearalenone and ochratoxin A in three Danish agricultural soils. *Chemosphere* 62(10). 1673-1680.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- Müller, G., Kielstein, P., Rosner, H., Berndt, A. et al. (1999). Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defence reactions in weaners, *Mycoses*, 42, 495 –505
- Muñoz, K., Campos, V., Blaszkewicz, M., Vega, M., Alvarez, A., Neira, J., Degen, GH. (2010). Exposure of neonates to ochratoxin A: first biomonitoring results in human milk (colostrum) from Chile. *MycotoxRes* 6, 59–67

## N

- National Toxicology Programm. (1982). Carcinogenicity bioassay of zearalenone in F344/N rats and F6C3F1 mice. Technical Report Series 235. Research Triangle Park, NC, USA.
- National Toxicology Programm. (1999). NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis studies of Fumonisin B1 (CAS No 116355-83-0) in F344/N rats and B6C3F1 Mice (Feed studies) (TR 496 ;NIH Publ. No. 99-3955), Research Triangle Park, USA.
- Neal, G.E., and Green, J.A. (1983). The requirement for glutathione S-transferase in the conjugation of activated aflatoxin B<sub>1</sub> during aflatoxin hepatocarcinogenesis in the rat. *Chemico-Biological Interactions* 45(2), 259-275.
- Newman, SJ., Smith, JR., Stenske, KA., Newman, LB., Dunlap, JR., Imerman, PM., and Kirk, CA. (2007). Aflatoxicosis in nine dogs after exposure to contaminated commercial dog food. *JVet Diagn Invest* 19,168–175.
- Nguyen, M T., Tozlovanu, M., Luyen Tran,T., and Pfohl-Leszkowicz, A. (2007). Occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub>, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry* 105 42–47.
- Noba, S., Uyama, A., & Mochizuki, N. (2009). Determination of Ochratoxin A in Ready-To-Drink Coffee by Immunoaffinity Cleanup and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6036-6040.
- Nogowski, L. (1996). Effect of the myco-oestrogen zearalenone on carbohydrate and lipid metabolism indices in ovariectomized female rats. Possible role of insulin and its receptor. *J.Anim. Physiol. A. Anim. Nutr.*, 75, 156-163
- Noonim , P., Mahakarnchanakul ,M., Nielsen ,K F., Frisvad, J C and Samson, R A.(2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*. 128, 197-202
- Norred W. (1993). Fumonisin: mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Toxicol. Environ. Health* 38, 309-328.

## O

- Obrecht-Pflumio, S., Grosse, Y., Pfohl-Leszkowicz, A., and Dirheimer, G. (1996). Protection by indomethacin and aspirin against genotoxicity of ochratoxin A, particularly in the urinary bladder and kidney. *Archives Of Toxicology* 70, 244-248.
- Obrecht-Pflumio, S., Chassat, T., Dirheimer, G., and Marzin, D. (1999). Genotoxicity of ochratoxin A by *Salmonella* mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 446, 95-102.
- Obrecht-Pflumio, S and Dirheimer, G. (2000). In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A. *Chemico-Biological Interactions* 127, 29-44.
- Obrecht-Pflumio, S., and Dirheimer, G. (2001). Horseradish peroxidase mediates DNA and deoxyguanosine 3'-monophosphate adduct formation in the presence of ochratoxin A. *Archives Of Toxicology* 75, 583-590.
- Obrecht-Pflumio, S., and Dirheimer, G. (2002). In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A. *Chemico-Biological Interactions*, 127, 29-44.

- Ogido, R., Oliveira, C.A.F., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E., Correa, B., Butkeraitis, P., Reis, T.A, Goncales, E., and Albuquerque R.(2004). Effects of Prolonged Administration of Aflatoxin B<sub>1</sub> and Fumonisin B<sub>1</sub> in Laying Japanese Quail.
- Olivares-Marín, M., Del Prete, V., Garcia-Moruno, E., Fernández-González, C., Macías-García, A., Gómez-Serran, V. (2008). The development of an activated carbon from cherry stones and its use in the removal of ochratoxin A from red wine, Food control.
- Omar, R.F., B.B. Hasinoff, F. Mejilla and A.D. Rahimtula. (1990). Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. Bio. Pharm. 40,1183- 1191.
- Omar, R.F., and Rahimtula, A.D. (1993). Possible role of an iron-oxygen complex in 4(S)-4-Hydroxyochratoxin a formation by rat liver microsomes. Biochemical Pharmacology 46(11), 2073-2081.
- Oswald, I.P., Desautels, P.F., Lafiite, J., Fournout, S., Peres, S.Y., Odin , M., Le Bars, P., Le bars, J., Fairbrother, J.M. (2003). Mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub> increases intestinal colonization by pathogenic E Coli in pigs. App. Environ Microbiol, 69, 5870-5874.
- Otieno, M. A., Baggs, R. B., Hayes, J. D., and Anders, M. W. (1997). Immunolocalization of microsomal glutathione S-transferase in rat tissues. Drug Metabolism And Disposition: The Biological Fate Of Chemicals 25, 12-20.
- Otteneeder, M., Lutz, W.K. (1999). Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts, Mutat. Res. 424, 237-247.
- Otto, J. C., and Smith, W. L. (1995). Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. Journal Of Lipid Mediators And Cell Signalling 12, 139-156.
- Ouanes-BenOthmen, Z., ElGolli, E., Abid-Essefi, S., Bacha, H. (2008). Cytotoxicity effects induced by Zearalenone Metabolites ,  $\alpha$  Zearalenol and  $\beta$  Zearalenol, on cultured Vero cells. Toxicology 252(1-3), 72-77.
- Ouyang, Y.L., Azcona-Olivera, J.I., Murtha, J. and Pestka, J.J. (1996). Vomitoxin-mediated IL-2, IL-4, and IL-5 superinduction in murine CD4+ T cells stimulated with phorbol ester calcium ionophore: relation to kinetics of proliferation. Toxicol. Appl. Pharmacol., 138(2), 324-34.
- Ozden, S., Akdeniz, AS., and Alpertunga, B. (2012). Occurrence of ochratoxin A in cereal-derived food products commonly consumed in Turkey. Food Control. 25(1), 69-74

## P

- Papadopoulou-Bouraoui, A, Vrabcheva, T, Valzacchi, S, Stroka, J, Anklam, E. (2004). Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzyme-linked immunosorbent assay. Food Addit Contam 21, 607-617.
- Papaioannou, D., Katsoulos, P.D., Panousis, N., Karatzias, H. (2005). The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: A review, Microporous and Mesoporous Materials 84, 161-170.
- Park, D.L., Lee, L.S., Price, R.L., and Pohland, A.E. (1988). Review of decontamination of aflatoxin by amoniation : current status and regulation. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71, 685-702.
- Patterson, E. L., Milstrey, R., and Stokstad, L. E. R. (1957). Effect of selenium in preventing exudative diathesis in chicks. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 95, 617-620
- Patterson, D SP., and Allcroft, R. (1970). Metabolism of aflatoxin in susceptible and resistant animal species. Food Cosmet Toxicol, 8, 46-53.
- Patterson, D.S.P. & Anderson, H. (1982). Recent aflatoxin feeding experiments in cattle. Vet. rec., 110, 60-64.
- Pattono, D.P., Gallo, F., Civera, T. (2011).Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. Food Chemistry 127, 374-377
- Paul, S., Breuninger, L.M., Tew, K.D., Shen, H., Kruh, G.D. (1996). ATP-dependent uptake of natural product cytotoxic drugs by membrane vesicles establishes MRP as a broad specificity transporter. PNAS (USA), 93, 6929-6934.
- Peraica M., Radic B., Lucic A., and Pavlovic M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. Bulletin of the World Health Organisation, 77(9), 754-766.
- Peraica, M., Domijan, M. A., Fuchs, R., Lucic, A., Radic, B., (1999). The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia, Toxicol. Lett. 110, 105-112.
- Peraica M., Domijan A.M., Šarić M. (2008). Mycotoxic and Aristolochic Acid Theories of the Development of Endemic Nephropathy . Archives of industrial hygiene and toxicology 59, 59-65.
- Pestka, J.J., TAI J.H., Witt, M.F., Dixon, D.E., and Forsell, J.H. (1987b). Suppression of immune response in the B6C3F1 mouse after dietaryexposure to the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. Food Chem. Toxicol, 25, 297-304.
- Pestka, J.J, Zhou HR. (2000). Interleukin-6-deicient mice refractory to IgA dys-regulation but not anorexia induction by vomitoxin (deoxynivalenol) ingestion. Food Chem Toxicol 38, 565-575.



- Pestka, J.J., Zhou, H.R., Moon, Y. and Chung, Y.J. (2004). Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol. Lett.*, 153(1), 61-73.
- Pestka, J.J. (2008). Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Addit. Contam.* 1-13.
- Peteri, Z., Teren, J., Vagvolgyia, C., Varga, J. (2007). Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts, *Food Microbiology* 24, 205–210
- Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., and Castegnaro, M. (1988). Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Additives And Contaminants* 5, 299-301.
- Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., Michelon, J., and Maru, V. (1991). Ochratoxin A and other mycotoxins in cereals from an area of Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. *IARC Scientific Publications* 83-87.
- Petkova-Bocharova, D., Castegnaro, M., Pfohl-Leskowicz, A., Garren L., Grosso, F., Nikolov, I., Dragacci, S., and Chernozemsky, I. N. (2003a). Analysis of ochratoxin A in serum and urine of inhabitants from an area with Balkan endemic nephropathy: a one month follow up study. *Facta Universitatis* 10, 57-62.
- Petkova-Bocharova, T., El Adlouni, C., Faucet V., Pfohl-Leskowicz, A., and Mantle, P. G. (2003b). Analysis for DNA adducts, ochratoxin A content and enzyme expression in kidneys of pigs exposed to mild experimental chronic ochratoxicosis. *Facta Universitatis* 10, 111-115.
- Petrik, J, MaliT, A, BariniT, K, Rumora, L, Kőszegi, T, Pepeljnjak S, LaniT-GrubiniT, T, and Bepelak, .I (2005). Ochratoxin A induces apoptotic and necrotic renal cell death. *Croat Chem Acta* 78:447–453
- Pfohl-Leskowicz, A., Chakor, K., Creppy, E. E., and Dirheimer, G. (1991). DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. *IARC Scientific Publications* 245-253.
- Pfohl-Leskowicz, A., Grosse, Y., Kane, A., Gharbi, A., Baudrimont, I., Obrecht, S., Creppy, E.-E., and Dirheimer, G. (1993a). Is the oxidative pathway implicated in the genotoxicity of ochratoxin A? *Human ochratoxicosis and its pathologies*, , 231, 177-187.
- Pfohl-Leskowicz, A., Grosse, Y., Castegnaro, M., Nicolov, I. G., Chernozemsky, I. N., Bartsch, H., Betbeder, A. M., Creppy, E. E., and Dirheimer, G. (1993b). Ochratoxin A-related DNA adducts in urinary tract tumours of Bulgarian subjects. *IARC Scientific Publications* 141-148.
- Pfohl-Leskowicz, A., Grosse, Y., Kane, A., Creppy, E. E., and Dirheimer, G. (1993c). Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 289, 265-273.
- Pfohl-Leskowicz, A., & Dirheimer, G. (1994a). Génotoxicité, mutagenèse et cancérogenèse : concepts moléculaires. *Biologia*, 1, 153-171.
- Pfohl-Leskowicz, A. (1994b). Effet des cancérogènes sur la méthylation biologique de l'ADN et détection des adduits a l'ADN. *Regard sur la biochimie*, 3, 51-61.
- Pfohl-Leskowicz, A., Chekir-Ghedira, L., and Bacha, H. (1995). Genotoxicity of zearalenone, a oestrogenic mycotoxin : DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis* 16, 2315-2320.
- Pfohl-Leskowicz, A., Pinelli, E., Bartsch, H., Mohr, U., and Castegnaro, M. (1998). Sex- and strain-specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. *Molecular Carcinogenesis* 23, 76-85.
- Pfohl-Leskowicz, A. : Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque. Editions TEC&DOC, Lavoisier, 1999 .Chapitre XI , page 113-115, 299, 307-310
- Pfohl-Leskowicz, A., Bartsch, H., Azemar, B., Mohr, U., Estève J., and Castegnaro, M. (2002a). MESNA protects rats against nephrotoxicity but not carcinogenicity induced by ochratoxin A, implicating two separate pathways. *Facta Universitatis* 9, 57-63.
- Pfohl-Leskowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., and Castegnaro, M. (2002b). Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives And Contaminants* 19, 282-302.
- Pfohl-Leskowicz, A., Molinié, A and Castegnaro. (2004). Presence of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B<sub>1</sub> in breakfast cereals in french market.comparaison of OTA analysis using or not immunoaffinity clean-up before HPLC. *The revesita Micologia*.
- Pfohl-Leskowicz, A., and Castegnaro, M. (2005). Further arguments in favour of direct covalent binding of ochratoxin A (OTA° after metabolic biotransformation. *Food additives and contaminants* 22(1).
- Pfohl-Leskowicz, A., Tozlovanu, M., Manderville, R., Peraica, M., Castegnaro, M, and Stefanovic, V. (2007). New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor.*Mol Nutr Food Res.* 51(9), 1131-46.
- Pfohl-Leskowicz, A., and Manderville, R. (2007). Review on Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nutr Food Res.* 51, 61-99 7.

- Pfohl-Leszkowicz, A., Molinié, A., Tozlovanu, M., and Manderville, R.A. (2008). Combined toxic effects of ochratoxin A and citrinin, in vitro and in vivo. In : Food contaminants ; mycotoxins & food allergen, DP Siantar, MW Trucksess, PM Scott & EM Herman (eds), ACS Symposium series 1001, 56-80
- Pfohl-Leszkowicz, A. (2008). Formation, Persistence and Significance of DNA Adduct formation in relation to some pollutants from a Broad Perspective - Advances in Molecular Toxicology. 2, 183-239
- Pfohl-Leszkowicz, A. (2009).Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Arch Hig Rada Toksikol*, 60, 465-483
- Pfohl-Leszkowicz, A., Grabryelski W, Manderville RA. (2009). Formation of 2' deoxyguanosine-carbon-8—bound ochratoxin A adduct in rat kidney DNA. *Molecular Nutrition Food Research*, 53, 1, 53, 154-155.
- Pfohl-Leszkowicz, A. (2009). Mycotoxins: risk factor of cancer. *African Journal of cancer*, 1, 42-55.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A. (2012). An update on direct genotoxicity as the molecular mechanism of ochratoxin A carcinogenicity. *Mol Nutr Food Res* 25(2), 252-262.
- Philips, T.D., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Taylor, D.R., Heidelbaugh, N.D. (1988). Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry science* 67(2), 243-247.
- Pier, A.C. (1992). Major biological consequences of alatoxicosis in animal production. *J.Anim. Sci.*, 70, 3964-3967.
- Pinelli, E., El Adlouni, C., Pipy, B., Quartulli, F., and Pfohl-Leszkowicz, A. (1999a). Roles of cyclooxygenase and lipoxygenases in ochratoxin A genotoxicity in human epithelial lung cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 7, 95-107.
- Pinelli, E., Poux, N., Garren, L., Castegnaro, M., Pipy, B., Miller, J.D., Pfohl-Leszkowicz, A. (1999b). Activation of Mitogen-activated protein kinase by fumonisin B<sub>1</sub> stimulates the arachidonic acid cascade and cAMP production, *Carcinogenesis*, 20, 1683-1688.
- Piskorska-Pliszczynka, J., Juskiewicz, T. (1990). Tissue deposition and passage into eggs of ochratoxin A in Japanese quail. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 10, 8–10.
- Piva, A., and Galvano, F. (1999). Nutritional approaches to reduce the impact of mycotoxins, *Biotechnology in the feed industry*, (Courtesy of Alltech Inc.)
- Pizzolitto, RP., Bueno, DJ., Armando, M.R., Cavaglieri, L., Dalcero, AM., and Salvano, M.A. (2011). Binding of Aflatoxin B<sub>1</sub> to Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: A Useful Model to Determine the Most Efficient Microorganism. *Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology*. 16. 323-346.
- Plank, G., Bauer, J., Grünkemeier, A., Fischer, S., Gedek, B., Berner, H.(1990). The protective effect of adsorbents against ochratoxin A in swine. *Tierarztl Prax* 18(5), 483-9.
- Plasencia, J., Mirocha, C.J. 1991. Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 146-150.
- Pohland, A. E., Nesheim S., and Friedman, L. (1992). Ochratoxin A: a review. *Pure and Appl.Chem.* 64, 1029-1046.
- Polisenska, I., Pfohl-Leszkowicz, A., Hadjeba, K., Dohnal, V., Jirsa, O., Denesova, O., Jezkova, A., and Macharackova, P. (2010) Occurrence of Ochratoxin A and citrinin in Czech cereals-Comparison of HPLC and ELISA methods for Ochratoxin A detection. *Food Additives and Contaminants*.27(11),1545-1557.
- Poirier, M.C., and Beland, F.A. (1992). DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chemical Research In Toxicology* 5, 749-755.
- Porter J.K., Wray E.M., Eppley R.M., Hagler W.M. (1998). Zearalenone and fusaric acid in the diet of nursing dams enhances both mycotoxins' lactational transfer to the suckling neonate. In : 112th AOAC International Annual Meeting and Exposition, Montréal, Québec, Canada, 13-17.
- Postupolski, J., and Karlowski, K. (1998). Contamination of human Milk with ochratoxin A, *Proceeding 20<sup>th</sup> Mykotoxin-Work- shop, Detmold* , 251-253.
- Potter, D. W., and Hinson, J. A. (1987). The 1- and 2-electron oxidation of acetaminophen catalyzed by prostaglandin H synthase. *The Journal Of Biological Chemistry* 262, 974-980.
- Poux, N., Pinelli, E., Castegnaro, M., Miller, D.J., Pfohl-Leszkowicz, A. (2000). Effects of fumonisin B<sub>1</sub> on cell signal transduction pathways: main role of MAPKs, in: W.J. de Koe, R.A. Samson, H.P.Van Egmond, J. Gilbert, M. Sabino (Eds) *Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millenium*, WJ Koe, The Netherland, 251-257.
- Prelusky, D.B., Hartin, K.E., Trenholm, H.L. and Miller, J.D. (1988). Pharmacokinetic fate of <sup>14</sup>C-labeled deoxynivalenol in swine. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10(2), 276-286.
- Premalatha, B., V. Sujatha and P. Sachdanandam. (1997). Modulating effect of *Semecarpus anacardium* Linn. nut extract on glucose metabolizing enzymes in aflatoxin B<sub>1</sub>-induced experimental hepatocellular carcinoma. *Pharmacol Res.* 36,187-192.
- Prescott, S. M., and Fitzpatrick, F. A. (2000). Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1470, M69-M78.

- Prior, M.G., O'Neil, J.B., Sisodia, C.S. (1980). Effects of ochratoxin A on growth response and residues in broilers. *Poult. Sci.* 59, 1254–1257.
- Pronk, M.E.J., Schothorst, R.C., VanEgmond, H.P. (2002). Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenonX, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyl deoxynivalenol a review of six trichothecenes. RIVM Report 388802024. National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands.
- Puhringer, S., Razzazi, E., Kubber, A., Iben C. (2003). Occurrence of ochratoxin A in commercial cat food and feline kidneys. In proceedings to the 7<sup>th</sup> conference of European society of Veterinary and comparative nutrition; dRUCK, C., Ed. 2003, p37.
- Purchase, I. F., and Van der Watt, J. J. (1971). The long-term toxicity of Ochratoxin A to rats. *Food and Cosmetics Toxicology* 9, 681-682.
- Pussa, T. (2007). Principles of food toxicology. Ed. CRC Press Inc., Tartu, Estonia.

## Q

- Qian, G. S., Ross, R. K., Yu, M. C., Yuan, J. M., Gao, Y. T., Henderson, B. E., Wogan, G. N., and Groopman, J. D. (1994). A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: a Publication Of The American Association For Cancer Research, Cosponsored By The American Society Of Preventive Oncology* 3, 3-10.

## R

- Rached, E., PfeiVer, E., Dekant, W., Mally, A. (2006). Ochratoxin A: apoptosis and aberrant exit from mitosis due to perturbation of microtubule dynamics? *Toxicol Sci* 92, 78–86
- Rahimtula, A. D., Bereziat, J.-C., Bussacchini-Griot, V., and Bartsch, H. (1988). Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin a toxicity. *Biochemical Pharmacology* 37, 4469-4477.
- Raiola, A., Meca, G., Mañes, J., Ritieni, A. (2012). Bioaccessibility of Deoxynivalenol and its natural co-occurrence with Ochratoxin A and Aflatoxin B in Italian commercial pasta. *Food and Chemical Toxicology* 50(2), 280-287.
- Raju, M.V.L.N., and Devegowda, G. (2000). Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science*. 41(5). 640-650.
- Ramos, A.J., Hernandez, E., Pla-Delfina, J.M., Merino, M. (1996b). Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non-nutritive sorbent materials. *Int. J. Pharm.* 128, 129–137.
- Randerath, K., Reddy, M. V., and Gupta, R. C. (1981). 32P-labeling test for DNA damage. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States Of America* 78, 6126-6129.
- Raney, K.D., Meyer, D.J., Ketterer, B., Harris, T.M., Guengerich, F.P. (1982b). Glutathione conjugated of aflatoxin B1 exo and endo epoxides by rat and human glutathione S –transferases. *Chem. Res. Toxicol* 5 (4), 470-478.
- Rastogi, R., A.K. Srivastava and A.K. Rastogi. (2001a). Long term effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on lipid peroxidation in rat liver and kidney: effect of picroliv and silymarin. *Phytotherapy Res.* 15, 307- 310.
- Rastogi, R., Srivastava, A.K., and Rastogi, A.K. (2001b). Biochemical changes induced in liver and serum of aflatoxin B1-treated male wistar rats: preventive effect of picroliv. *Pharm. and Toxic.* 88:53-58.
- Reddy, M. V., and Randerath, K. (1986). Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 7, 1543-1551.
- Reddy, K.R.N., Farhana, N.I., Salleh, B., and Oliveira, C.A.F. (2010). Microbiological Control of Mycotoxins: Present Status and Future Concerns ; *Formatex*, 1078-1086.
- Redman, C., Scott, J.A., Baines, A.T., Basye, J.L., Clark, L.C., Calley, C., Roe, D., Payne, C.M and Nelson, M.A. (2005). Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. *Cancer Letters* 125 (1-2), 103-110.
- Refai, M.K., Aziz, N.H., El-Far, F., and Hassan, A.A.. (1996). Detection of Ochratoxin Produced by *A.Ochraceus* in Feedstuffs and its Control by  $\gamma$  Radiation, *Appl. Radiat. Isot.*, 47, 61-621.
- Reinhard, H, and Zimmerli, B. (1999). Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. *J. Chromatogr. A* 862, 147-149.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. & van Schalkwyk, D.J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82, 353-357.
- Rice, J. R., Zenser, T. V., and Davis, B. B. (1985). Prostaglandin synthase-dependant cooxydation and aromatic amine carcinogenesis. In: L.J.Marnett (Ed.) *Arachidonic acid metabolism and tumor initiation*. Martinus Nijhoff Publishing, Boston 125-169.

- Rice, L.G. and Ross, F.P. (1994). Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. *J. Food Prot.* 57, 536-540.
- Richard, J.L., Stubbefield, R.D., Lyon, R.L., Peden, W.M., Thurston, J.R., Rimler, R.B. (1986). Distribution and clearance of aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in turkeys fed diets containing 50 or 150 ppb aflatoxin from naturally contaminated corn. *Avian Dis.* 30 (4) 788-793.
- Richard, J.L., Plattner, R.D., May, J., Liska, S.L. (1999). The occurrence of ochratoxin A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia* 146, 99-103
- Riley, R.T., Hinton, D.M., Chamberlain, W.J., Bacon, C.W., Wang, E., Merrill, A.H., JR., and Voss K.A. (1994). Dietary fumonisin B<sub>1</sub> induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity. *J Nutr.* 124, 594-603
- Riley, R.T., Voss, K.A., Norred, W.P., Sharma, R.P., Wang, E., Merrill, A.H.Jr. (1998). Mécanismes d'action des fumonisines, *Revue Med. Vet.* 149, 617-626.
- Ringot, D., Lerzy, B., Bonhoure, J-P., Auclair, E., Oriol, E., Larondelle, Y. (2005). Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochemistry* 40(9), 3008-3016
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y.J., and Larondelle, Y. (2006a). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update, *Chemico-Biological Interactions*, 159, 18-46.
- Ringot, D., Lerzy, B., Chaplain, K., Bonhoure, J-P., Auclair, E., Larondelle, Y. (2006b). In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models, *Bioresource Technology* 98(9), 1812-1821.
- Rizzi, L., Simioli, M., Roncada, P., and Zaghini, A. (2003a). Aflatoxin B<sub>1</sub> and clinoptilolite in feed for laying hens: effects on egg quality, mycotoxin residues in livers and hepatic MFO activities. *J. Food Prot.* 66, 860-865.
- Rizzi, L., Simioli, A., Altafini, A., and Zaghini, A. (2003b). Effect of an esterified glucomannan on laying hens exposed to combined mycotoxins (aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and fumonisin B<sub>1</sub>). *ITAL.J.ANIM.SCI.* 2 (1), 465-467.
- Rizzo, A.F., Atroshi, F., Ahotupa, M., Sankari, S., Elovaara, E. (1994). Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid-peroxidation induced by DON or T-2 toxin. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 41 (2), 81-90.
- Roth, A., Chakor, K., Creppy, E. E., Kane, A., Rosenthaler, R., and Dirheimer, G. (1988). Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology* 48, 293-308.
- Rotruck, J.T., A.L. Pope, H.E. Ganther, A.B. Swanson, D.G. Hafeman, and W. G. Hoekstra. (1973). Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588-590.
- Rotter, R.G., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., Abramson, D. (1990). Ensiling as a means of reducing ochratoxin A concentrations in contaminated barley. *J Sci Food Agric*, 50, 155-166.
- Rotter, B.A., Thompson, B.K., Prelusky, D.B., Trenholm, H.L., Stewart, B., Miller, J.D. & Savard, M.E. (1996) Response of growing swine to pure dietary 316idwestern B<sub>1</sub> during an 8 week period: growth and clinical parameters. *Nat. Toxins*, 4, 42-50.
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Fortin, A., Miller, J.D. & Savard, M.E. (1997) Impact of pure fumonisin B<sub>1</sub> on various metabolic parameters and carcass quality of growing-finishing swine-preliminary findings. *Can. J. Anim. Sci.*, 77, 465-470
- Roy, S. K and Kulkarni, A. P. (1997). Aflatoxin B<sub>1</sub> epoxidation catalysed by partially purified human liver lipoxigenase. *27( 2) , 231-241*
- Ruhland, M., Engelhardt, G., Wallnoefer, P.R., Schaefer, W. (1994). Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in wheat and maize cell suspension cultures. *Naturwissenschaften*, 81, 453-454.
- Ruhland, M., Engelhardt, G., Schaefer, W., Wallnoefer, P.R. (1996a). Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants: 1. Isolation and identification of metabolites formed in cell suspension cultures of wheat and maize. *Nat Toxins*, 4, 254-260.
- Ruhland, M., Engelhardt, G., Wallnoefer, P.R. (1996b). Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants. 2. Time course and rates of degradation and metabolite production in cell-suspension cultures of different crop plants. *Mycopathologia*, 134, 97-102.
- Rumora, L., Kovacic, S., Rozgaj, R., Cepelak, I., Pepeljnjak, S., and Zanic-Grubisic, T. (2002). Cytotoxic and genotoxic effects of fumonisin B<sub>1</sub> in rabbit kidney RK13 cell line. *Arch Toxicol* ;76:55-61.
- Russel, F.G., Masereeuw, R., van Aubel, R.A. (2002). Molecular aspect of renal anionic drug transport. *Annual review of physiology*, 64, 563-594.
- Ryan, M. J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S. M., Zager, R. A., Torok-Storb, B. (1994). HK-2 : an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult kidney, *Kidney Int.* 45, 48-57.

## S

- Sabater-Vilar, M., Maas, R. F., and Fink-Gremmels, J. (1999). Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. *Mutation Research* 444, 7-16.

- Saenz de rodriguez, C.A. (1984). Environmental hormone contamination in Puerto Rico. *N. Engl. J. Med.* 310, 1741-1742.
- Saenz de rodriguez, C.A., Bougiovanni, A.M. et Conde de borrego, L. (1985). An epidemic of precocious development in Puerto Rican children. *J. Pediatr*, 107, 393-396.
- Sakhare , P.S., Harne, S.D., Kalorey, D.R., Warke, S.R., Bhandarkar, A.G, and Kurkure, N.V. (2007) Effect of Toxiroak polyherbal feed supplement during induced aflatoxicosis, ochratoxicosis and combined mycotoxicoeses in broilers. *Veterinarski arhiV* 77 (2), 129-146.
- Sammon, AL. (2007). Carcinogens and endemic squamous cancer of the oesophagus in Transkei, South Africa. Environmental initiation is the dominant factor; tobacco or other carcinogens of low potency or concentration are sufficient for carcinogenesis in the predisposed mucosa. *Medical Hypotheses* 69, 125–131.
- Sander, M., Cadet, J., Casciano, D.A., Galloway, S.M., Marnett, L.J., Novak, R.F., Pettit, S.D., Preston, R.J., Skare, J.A., Williams, G.M., Van Houten, B., Gollapudi, B.B. (2005). Proceedings of a workshop on DNA adducts: biological significance and application to risk assessment Washington, DC, April 13–14 2004, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208, 1–20.
- Sandhu, B.S., Singh H. and Singh B. (1995). Patological studies in broiler chicks fed aflatoxin or ochratoxin and inoculated with inclusion body hepatitis virus singly and in occurrence. *Veterinary Research Communications*, 19, 27-37
- Santin, E., Paulillo, A.C., Nakagui, LSO., Alessi, A.C., Polveiro, W.JC., Maiorka, A. (2003). Evaluation of cell wall yeast as adsorbent of ochratoxin in broilers diets. *International journal of poultry science* 2(6), 465-468.
- Sardjono, N.A., Yasmashita, A., Yoshizawa, T. (1998) .Natural co-occurrence of aflatoxins and Fusarium mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. *Food Addit. Contam.* 15, 337–384.
- Sargeant, K., O'Kelly, J., Carnaghan, R.B.A., Allcroft, R. (1961). The essay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Vet Rec* , 73, 1219-1222.
- Sauvant, C., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1998). Exposure to Ochratoxin A Impairs Organic Anion Transportin Proximal-Tubule-Derived Opossum Kidney Cells. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 287, 13-20.
- Sauvant, C., Hesse, D., Holzinger, H., Evans, K.K., Dantzer, W.H., and Gekle, M. (2004). Action of EGF and PGE on basolateral organic anion uptake in rabbit proximal renal tubules and hOAT1 expressed in human kidney epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F774-F783.
- Sauvant, C., Holzinger, H., and Gekle, M. (2005). Proximal tubular toxicity of ochratoxin A is amplified by simultaneous inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *J Pharmacol Exp Ther* 313, 234–241
- Schaeffer, R.C. (1979). Failure of antivenin or corticosteroids to prevent lethal rattlesnake venom shock in the rat: R.C. Schaeffer, Jr., R.W. Carlson and M.H. Weil Shock Research Unit, University of Southern California, Los Angeles, USA. *Toxicon* 17, 163.
- Schaeffer, J.L., J.K. Tyczkowski and P.B. Hamilton. (1987). Alterations in carotenoid metabolism during ochratoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Sci.* 66:318-324.
- Schaeffer, J.L., J.K. Tyczkowski and P.B. Hamilton. (1988). Depletion of Oxycarotenoid Pigments in chickens and the Failure of Aflatoxin to Alter It. *Poult Sci* 67(6), 1080-1088.
- Schatzmayer, G., Heidler, D., Fuchs, E., Loibner, A.P., Braun, R., Binder, E-M. (2002). Evidence of ochratoxin A-detoxification activity of rumen fluid, intestinal fluid and soil samples as well as isolation of relevant microorganisms from these environments. *Mycotox. Res.*, 18A, 183-187.
- Schatzmayer, G., Heidler, D., Fuchs, E., Mohln, M., Täubel, M., Loibner, A-P., Braun, R., Binder, E-M. (2003). Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxine A. *Mycotox. Res.*, 19, 124-128.
- Schatzmayer, G., Schatzmayr, D., Täubel, M., Nitsch, S., Loibner, A. P., Binder, E.M. (2004): Mycotoxin detoxification and microorganisms in feeds. In: *J. Anim. Sci.* Vol. 82, Suppl. 1/J. Dairy Sci. Vol. 87, Suppl. 1/Poult. Sci. 83(1). Joint ADSA, ASAS and PSA Meeting, 2004, St. Louis, 78-79.
- Schatzmayer, G., Zehner, F., Schatzmayr, D., Täubel, M., and Binder, E.M. (2005). Microbiologicals for deactivating mycotoxins in contaminated feed, Communication orale, Symposium Euro-Magreb sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire, Fez, Maroc.
- Schatzmayer, G., Zehner, F., Täubel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner, A-P., Binder, E-M. (2006). Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol. Nutr. Food. Res.* 50, 543-551.
- Schatzmayer, D. (2008). Mycofix®: the sophisticated concept in mycotoxin deactivation. *The World Mycotoxin Forum*, the fifth conference, Noordwijk, Netherlands.
- Schlatter, C., Studer-Rohr, J., Rasonyi, T. (1996). Carcinogenicity and kinetic aspects of Ochratoxin A, *Food Add. Contam.* 13, 43–44.
- Schlatter, T. (2004). Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicol. Lett.* 153, 83-89.

- Schlosser, M. J., Shurina, R. D., and Kalf, G. F. (1990). Prostaglandin H synthase catalyzed oxidation of hydroquinone to a sulfhydryl-binding and DNA-damaging metabolite. *Chemical Research In Toxicology* 3, 333-339.
- Schmidt-Heydt, M., Graf, E., Batzler, J., Geisen, R. (2011). The Application Of Transcriptomics To Understand The Ecological Reasons Of Ochratoxin A Biosynthesis By *Penicillium Nordicum* On Sodium Chloride Rich Dry Cured. *Foods Trends in Food Science & Technology*. 22(1), 39-48
- Schothorst, RC., and Jekel, AA. (2003). Determination of trichothecenes in beer by capillary gas chromatography with lame ionisation detection. *Food Chem* 82, 475-479.
- Schramek, H., WilXingseder, D., Pollack, V., Freudinger, R., Mildenerger, S., and Gekle, M. (1997). Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular signaling-regulated kinases 1/2 is associated with Madin-Darby canine kidney-C7 cell dediVerentiation. *J Pharmacol Exp Ther* 283, 1460-1468
- Schrauzer, G.N. (2000). Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. *J. Nutr.* 130 (7), 1653-1656
- Schubert, J.R., O. H. Muth, J.E. Oldfield, and L.F. Remmert. (1961). Experimental results with selenium in white muscle disease of lambs and calves. *Fed. Proc.* 20, 689-694.
- Schwartz, K., and C. M. Foltz. (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3292-3293
- Schwartz, G.G. (2001). Hypothesis: Does ochratoxin A cause testicular cancer? *Cancer Causes and Control* 13, 91-100.
- Schwerdt, G., Freudinger, R., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1998). Apical uptake of radiolabelled ochratoxin A into Madin-Darby canine kidney cells. *Toxicology* 131, 193-202.
- Schwerdt, G., Bauer, K., Gekle, M., and Silbernagl, S. (1996). Accumulation of ochratoxin A in rat kidney in vivo and in cultivated renal epithelial cells in vitro. *Toxicology* 114, 177-185.
- Schwerdt, G., Freudinger, R., Mildenerger, S., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1999a). The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. *Cell Biol Toxicol* 15,405-415
- Schwerdt, G., Freudinger, R., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1999b). Ochratoxin A-binding proteins in rat organs and plasma and in different cell lines of the kidney. *Toxicology* 135, 1-10.
- Schwerdt, G., Freudinger, R., Schuster, C., Silbernagl, S., Gekle, M. (2004). Inhibition of mitochondria and extracellular acidification enhance ochratoxin A-induced apoptosis in renal collecting duct-derived MDCK-7 cells. *Cell Physiol Biochem* 14, 47-56.
- Scoggan, K.A., Jakobsson, P.J., and Ford-Hutchinson, A.W. (1997). Production of Leukotriene C<sub>4</sub> in Different Human Tissues Is Attributable to Distinct Membrane Bound Biosynthetic Enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 10182-10187.
- SCOOP. (2003). Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake of the population of EU member states. Directorate-general health and consumer protection. Available : <http://europa.eu.int:comm/food/fs:scoop:task3210.pdf> (Accessed Nov 20, 2008).
- Scott, P.M. (1993). Fumonisin. *Int J Food Microbiol* 18, 257-270.
- Scott, P.M. (1995). Mycotoxin methodology. *Food Addit. Contam* 12, 395-403.
- Scudamore, K. A., and Hetmanski, M. T. (1995). Natural occurrence of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in cereals in the United Kingdom. *Food Addit.Contam* 12, 377-382.
- Scudamore, K. A., Hetmanski, M. T., Chan, H. K., and Collins, S. (1997). Occurence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food Addit.Contam* 14, 157-173.
- Scussel, VM., Glordano, BN., Simao, V., Rocha, MW., dos Reis, L.F.C. and. Xavier, J.J.M. (2006). Mycotoxin evaluation in pet food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *The World Mycotoxin Forum*, Cincinnati, USA, p 11.
- Sedmikova, M., Reisnerova, H., Dufkova, Z., Barta, I., Jilek, F. (2001). Potential hazard of simultaneous occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub> and Ochratoxin A. *Vet.Med-Czech*.46,169-174.
- Seefelder, W., Humpf, HU., Schwerdt, G., Freudinger, R., Gekle, M. (2003). Induction of apoptosis in cultured human proximal tubule cells by fumonisins and fumonisin metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 192, 146-153
- Sharma, M., and Marquez, C. (2011). Determination of aflatoxins in pet foods (dog and cat) using imunoafinity comumn and HPLC. *Animal feed science and technology*.93, 109-114.
- Shen, H.M., Shi, C.Y., Lee, H.P., and Ong, C.N. (1994). Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxic. and Appl. Pharm.* 127, 145-150.
- Shen, H.M., C.N. Ong and C.Y. Shi. (1995). Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B<sub>1</sub>-induced cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicology* 99, 115-123.
- Shephard, GS., Marasas, WF., Leggott, NL., Yazdanpanah, H., Rahimian, H., Safavi, N. (2000). Natural occurrence of fumonisins in corn of Iran. *J Agr Food Chem* 48, 1860-1864
- Shetty, P.H., and Jespersen, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 48-55

- Shetty, PH., Hald, B., Jespersen, L. (2007). Surface binding of aflatoxin B<sub>1</sub> by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology* 113, 41–46
- Shi, C.Y., Hew, Y.C., and Ong, C.N. (1995). Inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub>-induced cell injury by selenium: an in vitro study. *Hum Exp Toxicol* 14, 55-60.
- Shibutani, S. (1994). Mutagenic specificity of acetylaminofluorene-derived DNA adducts in vitro. *IARC Scientific Publications* 457-462.
- Shirley, HV., & Tohala, SH. (1983). Ochratoxicosis in Laying hens. 1982 Annual Science Progress report 83-08. University of Tennessee Agriculture experiment Station.
- Shreeve, B.J., Patterson, D.S.P., Pepin, G.A., Roberts, B.A. and Wzathall, A.E. (1977). Effect of feeding ochratoxin to pigs during early pregnancy. *Brit. Vet. J.* 133, 412-417.
- Shuker, D. E., and Farmer, P. B. (1992). Relevance of urinary DNA adducts as markers of carcinogen exposure. *Chemical Research In Toxicology* 5, 450-460.
- Siliart, B. (2007). Role des oligo-éléments dans le stress oxydatif. *Bull. Group. Tech. Vet.* (38), 44-50.
- Silverman, J. A. (1999). Multidrug-resistance transporters. *Pharmaceutical Biotechnology* 12, 353-386.
- Simarro Doorten, A. Y., Nijmeijer S, de Nijs-Tjon L, and Fink-Gremmels, J. (2005). Metabolism-mediated Ochratoxin A genotoxicity in the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Food Chem Toxicol.* 44(2), 261-270
- Singer, B., and Essigman, J.M. (1991). Site-specific mutagenesis: retrospective and prospective. *carcinogenesis* 12, 949-955.
- Singh, R., and Farmer, P.B. (2006). Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection, *Carcinogenesis* 27, 178–196.
- Skaug MA., Størmer, FC., Saugstad, OD. (1998). Ochratoxin A: a naturally occurring mycotoxin found in human milk samples from Norway. *Acta Paediatrica* 87(12), 1275–1278.
- Skaug, M.A. (1999). Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 16 (2), 75-78.
- Smith, JS., and Thakur, RA. (1996). Occurrence and fate of fumonisins in beef. *Adv Exp Med Biol* 392, 39-55.
- Smith, W.L., and Fitzpatrick F.A. (1996). The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxigenase pathways. In: *Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes* (V.D.E. and V.J.E. Eds) Elsevier Science B.V. 283-308.
- Smits, G.J., Kapteyn, J.C., van den Ende, H., and Klis, F.M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2, 348-352.
- Smits, G.J., van den Ende, H., and Klis, F.M. (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* 147, 781-794.
- Sobrova, P., Adam, V., Vašatková, A., Beklova, M., Zeman L., Kižek, R. (2010). Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisc Toxicol.* 3(3), 94-99.
- Solti, L., Pecsí, T., Barna-Vetro, I., Szasz, F., Biro, K., Szabo, E. (1999). Analysis of serum and seminal plasma after feeding ochratoxin A with breeding boars. *Anim Reprod Sci.* 56, 123-132.
- Son, W.C., Kamino, K., Lee, Y.S., Kang, K.S. (2003). Strain-specific mammary proliferative lesion development following lifetime oral administration of ochratoxin A in DA and Lewis rats, *Int. J. Cancer*, 105, 305–311.
- Sonjak, S., Liën, M., Frisvad, J C., Gunde-Cimerman, N. (2011). Salting of dry-cured meat a potential cause of contamination with the ochratoxin A-producing species *Penicillium nordicum*. *Food Microbiology.* 28(6), 1111-1116.
- Souza, M.F., A.R. Tome and V.S. Rao. (1999). Inhibition by the bioflavonoid tannin of aflatoxin B<sub>1</sub>-induced lipid peroxidation in rat liver. *J. of Pharm. and Pharm.* 51, 125-129.
- Sorenson, W.G., Simpson, J.P., Peach III, M.J., Thedell, T. D., and Olenchok, S.A. (1981). Aflatoxin in respirable corn dust particles. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 7(3-4), 669-672.
- Soule, HD. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51, 1409 – 1416.
- Spallholz, JE. (1994). On the nature of selenium toxic and carcinostatic activity. *Fre Radic Biol Med*, 17, 45-64.
- Speijers, G.J.A., and Speijers, M.H.M. (2004). Combined toxic effects of mycotoxins *Toxicology Letters* . 153, 91–98.
- Sprunsky, M., Gadzała-Kopciuch, R., Nowak, K., and Buszewski, B. (2012). Removal of zearalenone toxin from synthetic gastric and body fluids using talc and diatomite: a batch kinetic study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. (sous presse).
- Stander, M.A., Bornscheuer, T., Henke, E., Steyn, P.S. (2000). Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5736–5739
- Standnik, A., Wojtowicz-Chomicz, K., and Borzecki, A. (2010). Influence of zearalenone on free radical reactions in rat liver cells. *Bull Vet Inst Pulawy* 54, 611-615,



- Starkl, V. (2004a), Mycotoxin in feeds-Prevention and control. Product Manager. Biomin Innovative animal Nutrition. Industriestrasse 21, 3130 Herzogenburg, Austria. AFMA FORUM 2004.
- Starkl, V. (2004b), Elimination de la toxicité de l'OTA, de la ZON et des trichotécènes. Biomin Newsletter. 2 (19), Octobre 2004.
- Stefanovic, V., D. Toncheva, S. Atanasova and M. Polenakovic, 2006. Etiology of Balkan Endemic Nephropathy and associated urothelial cancer. *Am. J. Nephrol.* 26: 1-11.
- Stegen, G.V.D., Jörissen, U., Pittet, A, Saccon, M., Steiner, W., Vincenzi M., Winkler, M., Zapp, J., and Schlatter, Chr. (1997). Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). *Food Additives and Contaminants* 14(3), 211-216
- Stegen, G V.D., Essens, P J M., and Lijn, JVD. (2001). Effect of Roasting Conditions on Reduction of Ochratoxin A in Coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (10), 4713-4715
- Stenske, KA., Smith, JR., Newman, SJ., Newman, LB., Kirk, CA. (2006). Aflatoxicosis in dogs and dealing with suspected contaminated commercial foods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228 , 1686-1691
- Stieger, B., and Meier, P. J. (1998). Bile acid and xenobiotic transporters in liver. *Current Opinion In Cell Biology* 10, 462-467.
- Stockmann-Juvala, H., Mikkola, J., Naarala, J., Loikkanen, J., Elovaara, E., In Savolainen, K. (2004). Oxidative stress induced by fumonisin B<sub>1</sub> in continuous human and rodent neural cell cultures. *Free Rad Res* 38:933-942.
- Stockmann-Juvala, H., Naarala, J., Loikkanen, J., Vähäkangas, K., Savolainen, K. (2006). Fumonisin B<sub>1</sub>-induced apoptosis in neuroblastoma, glioblastoma and hypothalamic cell lines. *Toxicology* 225, 234-241
- Stoev, S.D., Hald, B., Mantle, P. (1998a). Porcine nephropathy in Bulgaria: a progressive syndrome of complex of uncertain (mycotoxin) etiology. *Vet Rec* 142, 90-194
- Stoev, S. D. (1998). Some Metric, Antidote and Pathomorphological Investigations in Experimental Intoxication with Ochratoxin A and Penicillic Acid in Chicks. *Bulg. J. Agric. Sci.* 4, 551-563.
- Stoev, S. D., Anguelov, G., Ivanov, I., Pavlov, D. (2000). Influence of ochratoxin A and an extract of artichoke on the vaccinal immunity and health in broiler chicks. *Exp. Toxicol. Pathol.* 52, 43-55.
- Stoev, S. D., Goundasheva, D., Mirtcheva, T., Mantle, P. (2000). Susceptibility to bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis, *Exp. Toxicol. Pathol.* 52, 287-296
- Stoev, S.D., Vitanov, S., Anguelov, G., Petkova-Bocharova, T., Creppy, E.E. (2001). Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid. *Vet. Res. Commun.* 25, 205-223.
- Stoev, S. D., Paskalev, M., MacDonald, S., Mantle, P. G. (2002). Experimental 1 year ochratoxin A toxicosis in pigs, *Exp. Toxicol. Pathol.* 53, 481-487.
- Stoev, S.D., Daskalov, H., Radic, B., Domijan, A., Peraica, M. (2002a). Spontaneous mycotoxic nephropathy in Bulgarian chickens with unclarified mycotoxin aetiology. *Veterinary Research* 33, 83-94.
- Stoev, S.D., Koynarsky, V., Mantle, P.G. (2002b). Clinicomorphological studies in chicks fed ochratoxin A while simultaneously developing coccidiosis. *Veterinary Research Communications* 26, 189-204.
- Stoev, S.D., Djuvinov, D., Mirtcheva, T., Pavlov, D., Mantle, P. (2002). Studies on some feed additives giving partial protection against ochratoxin A in chicks, *Toxicology Letters* 135, 33-50
- Stoev, S.D., Stefanov, M., Denev, S., Radic, B., Domijan, A-M., Peraica, M., 2004. Experimental mycotoxicosis in chickens induced by ochratoxin A and penicillic acid and intervention by natural plant extracts. *Veterinary Research Communications* 28, 727-746.
- Stoev, SD. (2008). Review Complex Etiology, Prophylaxis and Hygiene Control in Mycotoxic Nephropathies in Farm Animals and Humans. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 578-605.
- Stoev, SD., Njobeh, P.B., Mosonik, J.S. M.F. Dutton, and Steenkamp, P.A. (2010a). Mycotoxic nephropathy in Bulgarian pigs and chickens : complex aetiology and similarity to Balkan Endemic Nephropathy. *Food Additives and Contaminants*, 27(1), 72-88.
- Stoev, S. (2010). Studies on Carcinogenic and Toxic Effects of Ochratoxin A in Chicks. *Toxins* 2, 649-664.
- Stoev, SD., Gundasheva, D., Zarkov, I., Mircheva, T., Zapryanova, D., Denev, S., Mitev, Y., Daskalov, H., Dutton, M., Mwanza, M., Schneider, Y.J. (2011). Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a mouldy diet containing ochratoxin A and fumonisin B<sub>1</sub>. *Experimental and Toxicologic Pathology (sous presse)*.
- Stoev, S.D., Denev, S., Dutton, M.K., Njobeh, P.B., Mosonik, J.S., Steenkamp, P.O., and Petkov, J. (2010b). Complex etiology and pathology of mycotoxic nephropathy in South African pigs *Mycotox Res* 26, 31-46
- Stoev, S.D., Gundasheva, D., Zarkov, I., Mircheva, T., Zapryanova, D., Denev, S., Mitev, Y., Daskalov, H., Dutton, M., Mwanza, M., and Schneider, Y.J. (2011). Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a mouldy diet containing ochratoxin A and fumonisin B<sub>1</sub> *Experimental and Toxicologic Pathology*, xx
- Støren, O., Holm, H., and Stormer, F. C. (1982). Metabolism of ochratoxin A by rats. *Applied And Environmental Microbiology* 44, 785-789.



- Stubblefield, R.D., Honstead, J.P., and Shotwell, O.L. (1991). An analytical survey of aflatoxins in tissues from swine grown in regions reporting 1998 aflatoxin-contaminated corn. *JAOAC*, 74, 897-899.
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, J., & Schlatter, C. (1994). OTA and coffee. *Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg.*, 85, 719 - 727.
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, J., and Schlatter, C., (1995). The occurrence of Ochratoxin A in coffee, *Fd. Chem. Toxic.* 33, 341-355.
- Studer-Rohr, I., Schlatter, J., and Dietrich, D. R. (2000). Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives Of Toxicology* 74, 499-510.
- Štyriak I, Conkova E, Kmec V, Bohm J, Razzazi E. (2001). The use of yeast for microbial degradation of some selected mycotoxins. *Mycotoxin Res.*17, 24-27.
- Suarez Quiroz, M.L. (2004). Etude des conditions de production d'ochratoxine A dans le café. Contrôle et prévention de sa formation, thèse de l'université de Montpellier II.
- Suàrez-Quiroz, M., González-Rios, O., Barel, M., guyot, B., Schorr-galindo, S., and Guiraud, J.P. (2004). Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee, *food microbiology* 21, 629-634.
- Sugita-Konishi, Y., Park, B.J., Kobayashi-Hattori, K., Tanaka, T., Chonan, T., Yoshi-kawa, K., Kumagai, S. (2006). Effect of cooking process on the deoxynivalenol content and its subsequent cytotoxicity in wheat products. *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 1764-1768.
- Sun, XM., Zhang, XH., Wang, HY., Cao, WJ., Yan, X., Zuo, LF., Wang, JL., Wang, FR. (2002). Effects of sterigmatocystin, deoxynivalenol and alatoxin G(1) on apoptosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Biomed Environ Sci* 15, 145-152.
- Sundstol, Eriksen., G., Pettersson, H., and Lundh, T. (2004). Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food. Chem. Toxicol.*, 42(4), 619-624.
- Surai, P.F., Noble, R.C and. Speake, B.K. (1999). Relationship between vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation in tissues of the newly hatched chick. *British Poultry Sci.* 40, 406- 410.
- Surai, P.F. (2000.) Effect of the selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. *British Poultry Sci.* 41, 235-243.
- Surai, P.F., and Dvorska, J.E. (2001). Is organic selenium better for animals than inorganic sources? Two different scenarios in stress conditions. *Feed Mix* 9, 8-10.
- Surai, P.F., Speake, B.K and Sparks. N.H.C. (2001). Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 2. Antioxidant properties and discrimination in embryonic tissues. *J. of Poultry Sci.* 38, 117-145.
- Surai, P.F., Dvorska, J.E. (2005). Effects of mycotoxins on antioxidant status and immunity, in Diaz, DE (ed) "The mycotoxin blue book". 93-137
- Suzuki, K. T. (2005). Metabolomics of selenium : Se metabolites based on speciation studies. *Journal of health science.* 51 (2), 107-114.
- Swanson, S.P., Helaszek, C., Buck, W.B., Rood, H.D., Jr. and Haschek, W.M. 1988. The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. *Food. Chem. Toxicol.*, 26(10), 823-829.
- Swenberg, J.A., (2004). Toxicological considerations in the application and interpretation of DNA adducts in epidemiological studies, *IARC Sci. Publ.* 157, 237-246.
- Sypecka, Z., Kelly, M., and Brereton, P. (2004). Deoxynivalenol and zearalenone residues in eggs of laying hens fed with a naturally contaminated diet: Effects on egg production and estimation of transmission rates from feed to eggs. *J Agric Food Chem* 52, 5463-5471.
- Szczecz, GM., Carlton, WW., Tuite, J. (1973). Ochratoxicosis in beagle dogs. I. Clinical and clinicopathological features. *Vet. Pathol* 10, 135-154.
- Szczecz, GM., and Hood, RD. (1978). Anima model of human disease. *American Journal of Pathology.* 91(3), 689-692.

## T

- Tajima, O., Schoen, ED., Feron, VK., Groten, JP. (2002). Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of *Fusarium* mycotoxins for possible interactions. *Food Chem Toxicol* 40, 685-695.
- Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Kakeya, H., Osada H., Yamaguchi, I. (2002). A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *Biochem. J.*, 365, 1-6.
- Talaska, G., Maier, A., Henn, S., Booth-Jones, A., Tsuneoka, Y., Vermeulen, R., Schumann, B.L. (2002). Carcinogen biomonitoring in human exposures and laboratory research: validation and application to human occupational exposures, *Toxicol. Lett.* 134, 39-49.
- Tamames, Fernando. (2009). Target organs - The key to an effective mycotoxins adsorbent, Special Nutrients Inc.

- Tandon, BN., Krishnamurthy, L., Koshy, A., Tandon, HD., Ramalingswami, V., Bhandari, JR., Mathur, MM., and Mathur, PD. (1977). Study of an epidemic of jaundice, presumably due to toxic hepatitis, in northwest India. *Gastroenterology*, 72, 488-494.
- Taningher, M., Malacarne, D., Mancuso, T., Peluso, M., Pescarolo, M.P., and Parodi, S. (1997). Methods for predicting carcinogenic hazards: new opportunities coming from recent developments in molecular oncology and SAR studies, *Mutat. Res.* 391, 3–32.
- Tansakul, N., Kusujarit, N., Lekcharoensuk, Witoonsatian, K., and Songserm, T. (2011). Ochratoxicosis on hematological and blood chemistry profiles in ducks. *Proceeding 33<sup>rd</sup> Mycotoxin workshop*, Freising, Germany, 30<sup>th</sup> May-1<sup>st</sup> June 2011, pp 138
- Tapia M. O., and Seawright, A. A. (1985). Experimental combined aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A intoxication in pigs. *Aust Vet J* 62, 33-37.
- Tawfek, N.S., Abdel-Aziz, K.B., Farag, IM., Nada, S.A., Farouk, T., Amra, H., and Darwish H.R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* modulates Aflatoxin-induced toxicity in male Albino mice. *Report and Opinion*. 3(12). 32-43
- Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. & Gelderblom, W.C.A. (1992) The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia*, 117, 3-9
- Toutain H., Courjault F., and Cordier A. (1992). Renal proximal tubule cell culture: characterisation and use in nephrotoxicology. *In vitro methods in toxicology* 93-127.
- Tran, S. T., Bailly, J. D., Tardieu, D., Durand, S., Benard, G., Guerre, P.(2003). Sphinganine to sphingosine ratio and predictive biochemical markers of fumonisin B1 exposure in ducks, *chemico-interaction-biological*, 146, 61-72.
- Tran, S.T., Tardieu, D., Auvergne, A., Bailly, J.D., R. Babilé, Durand, S., Benard, G., Guerre, P. (2006). Serum sphinganine and the sphinganine to sphingosine ratio as a biomarker of dietary fumonisins during chronic exposure in ducks, *Chemico-Biological-Interaction*, 160, 41-50.
- Trenholm, H.L., Thompson, B.K., Hartin, K.E., Greenhalg, R. & McAllister, A.J. (1985) Ingestion of vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat by non lactating dairy cows. *J. dairy Sci.*, 68, 1000-1005
- Trucksess, M.W., Richard, J.L., Stoloff, L. (1983). Absorption and, distribution patterns of aflatoxicol and aflatoxin B1 and aflatoxin M1 in blood and milk of cows given aflatoxin B. *Am.J.Vet*, 44,1753-1756.
- Tsubouchi, H., Yamamoto, K., Hisada, K., Sakabe, Y., and Udagawa, S.I. (1987). Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. *Mycopathologia* 97(2), 111-115.
- Tutelyan, V.A. (2004). Deoxynivalenol in cereals in Russia. *Toxicol. Lett.*, 153(1), 173-9.
- Tozlovanu, M., V. Faucet-Marquis, A. Pfohl-Leskowicz and R.A. Manderville, (2006a). Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: Structure-activity relationships for covalent DNA adduction. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1241-1247
- Tozlovanu, M., Faucet-Marquis, V., Molinié, A., Castegnaro, M., Manderville, R. A., Pfohl-Leskowicz, A. (2006b). Citrinin enhances the toxic and Genotoxic effects of ochratoxin A in vitro and in vivo. *Coll. Antropol.* 30 (1), 18
- Tozlovanu, M., Faucet-Marquis, V., Molinié, A., Castegnaro, M., Manderville, R. A Pfohl-Leskowicz, A. (2006c). Combined toxic effects of ochratoxin A and citrinin, in vitro and in vivo. *Proceeding of the ACS meeting San Francisco*, September 2006c
- Tozlovanu, M. (2008 thèse): Evaluation du risqué de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérogènes (notamment l'ochratoxine A): validation de biomarqueurs d'exposition d'effet. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Tozlovanu, M., and Pfohl-Leskowicz, A. (2010). Ochratoxin A in Roasted Coffee from French Supermarkets and Transfer in Coffee Beverages: Comparison of Analysis Methods. *Toxins*, 2(8), 1928-1942.
- Tyczkowski, J.K., Hamilton, P.B. (1987a). Altered Metabolism of Carotenoids During Aflatoxicosis in Young Chickens *Poultry Sci.* 66,1184-1188.
- Tyczkowski, J.K., Hamilton, P.B. (1987b). Metabolism of Lutein Diester During Aflatoxicosis in Young Chickens. *Poult. Sci.* 66(12), 2011-2016

## U

- Ueno, Y., Kubota, K. (1976). DNA –attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*. *Cancer Res*, 36,445-451.
- Ueno, Y., Ijima, K., Wang, D., Sugiura, Y., Sekijima, M., Tanaka, T., Chen, C. & Yu, S.-Z. (1997) Fumonisins as a possible contributory risk factor for primary liver cancer : A 3-year study of corn harvested in Haimen, china, by HPLC and ELISA. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 1143-1150.
- Underhill, K. L., Rotter, B. A., Thompson, B. K., Prelusky, D. B., Trenholm, H. L. (1995). Effectiveness of

- Cholestyramine in the Detoxification of Zearalenone as Determined in Mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 128–134
- Underwood, E. J., and N. F. Suttle. (2001). *The Mineral Nutrition of Livestock*. 3rd ed. CAB International, Wallingford, UK.
- V
- Vadi, H.V., Schasteen, S.S., and Reed, D.J. (1985). Interactions of S-(2-haloethyl)-mercapturic acid analogs with plasmid DNA. *Toxicology and Applied Pharmacology* 80(3), 386-396.
- Vaid, J., Dawra, R.K., Sharma, O.P. & Negi, S.S. (1981) Chronic aflatoxicosis. *Vet. Human Toxicol.*, 23, 436-437.
- Vail, R.B., and Homann, M.J. (1990). Rapid and sensitive detection of citrinin production during fungal fermentation using high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.A* 535, 317-323.
- Valenta, H., and Goll, M. (1996). Determination of ochratoxin A in regional samples of cow's milk from Germany. *Food Additives and Contaminants*, 13 (6), 669-676.
- Van Bladeren, P.J., Breimer, D.D, Rotteveel-Smijds, G.M.T., De Jong, R.A.W., Buijjs, W., Van der Gen, A., and Mohn, G.R. (1980). The role of glutathione conjugation in the mutagenicity of 1,2 dibromoethane. *Biochemical Pharmacology* 29(21), 2975-2982.
- Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., and Fourie, L. (1965a). Mycotoxins. II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Journal Of The Chemical Society.Perkin Transactions 1*, 7083-7088.
- Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., and Theron, J. J. (1965b). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205, 1112-1113.
- Van Egmond, H.P. (1989a) Aflatoxin M<sub>1</sub> occurrence, toxicity, regulation. In: van Egmond, HP (Ed) *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Applied Science Publisher LTD, Barking, Essex, England pp 11-55.
- Van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A., and . (1994). Survey of data on the incidence and levels of Ochratoxin A in Food and animal feed worldwide. *journal of Natural Toxins* 3, 125-144.
- Van Egmond, H. P. (1996). Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. *Food Addit.Contam* 13, 11-13.
- Var, I., Erginkaya, Z., and Kabak, B. (2009). Reduction of Ochratoxin A Levels in White Wine by Yeast Treatments. *J. Inst. Brew.* 115(1), 30–34.
- Varga, J., Rigo, K., Teren, J. (2000). Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 59, 1-7.
- Varga, J., and Kozakiewicz, Z. (2006). ochratoxin A in grapes and grape-derived products, *Trends in Food Sciences and Technology* 17, 72-81.
- Varga, J., Kocsu, S., Péteri, Z., Vágölygyi, C., and Tóth, B. (2010). Review Chemical, Physical and Biological Approaches to Prevent Ochratoxin Induced Toxicoses in Humans and Animals. *Toxins* 2, 1718-1750.
- Vekiru, E. (thèse 2009). Towards the development of a novel biological feed additive for mycotoxin degradation: Isolation, structural elucidation and quantification of biotransformation-products of the estrogenic zearalenone.. , 257; Technische Universität Wien.
- Vekiru, E., Hametner, C., Mitterbauer, R., Rechthaler, J., Adam, G., Schatzmayr, G., Krska, R., and Schuhmacher, R.(2010). Cleavage of Zearalenone by *Trichosporon* mycotoxinivorans to a Novel Nonestrogenic Metabolite. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (7) 2353-2359.
- Veldman, A.J., Meijjs, A.C., Borggreve, G.J., Heeres-van der Tol, J.J. (1992). Carry-over of aflatoxins from cows' food to milk. *Anim Prod* 55, 163-168.
- Verger, P., Volatier, J. L., and Dufour A. (1999). Estimation des niveaux théoriques d'ingestion d'aflatoxines et d'ochratoxine. Dans: *Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque*.TEC&DOC, Lavoisier.
- Verma, R.J., and Shalini, M. (1998). Hyperglycemia induced in rabbits exposed to ochratoxin. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* 60, 626-631
- Verma, J., Swain, B.K., and Johri, T.S.(2002) Effect of various levels of aflatoxin and Ochratoxin A and combinations there of on Protein and energy utilisation in broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82:1412-1417
- Verma, J., Johri, T.S., and Swain, B.K. (2003). Effect of varying levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and egg quality characteristics in laying hens. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 16, 1015–1019.
- Verma, J., Johri, T.S., and Swain, B.K. (2007). Effect of aflatoxin, ochratoxin and their combination on protein and energy utilisation in white leghorn laying hens. *J. Sci. Food Agric*, 87, 760–764.
- Vesley, D., Vesela, D., and Jelinek, R. (1983). Comparative assessment of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, and M<sub>1</sub> embryotoxicity in the chick embryo. *Toxico Lett*, 15,297-302.

- Vesonder, R.F., Ciegler, A. and Jensen, A.H. (1973). Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. *Appl. Microbiol.*, 26(6),1008-10.
- Vettorazzi, A., Gonzalez-Peñas, E., Trocóniz, I.F., Arbillaga, L., Corcuera, L.A., Gil, AG, López De Cerain ,A .(2009). A different kinetic profile of ochratoxin A in mature male rats. *Food & Chemical Toxicology*, 47, 1921-1927.
- Vettorazzi, A., Trocóniz, I.F., Gonzalez-Peñas, E., Corcuera, L.A., Arbillaga, L., Gil, AG, Nagy, J.M., Mantle, P.G., López De Cerain, A. (2010). Effects of fasting and gender on ochratoxin A toxicokinetics in F344 rats. *Food & Chemical Toxicology*, 48, 3159- 3166.
- Vettorazzi, A., Fernández de Trocóniz, I., González-Peñas, E., Arbillaga, L., Corcuera, LA., Gil, AG., López de Cerain, A. (2011). Kidney and liver distribution of ochratoxin A in male and female F344 rats *Food & Chemical toxicology*, 49, 1935-1942.
- Villa, P., and Markaki, P. (2009). Aflatoxin B and ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: Occurrence and risk assessment *FoodControl*.20, 455-461
- Vidal, D.R. (1990). Propriétés immunosuppressives des mycotoxines du groupe des trichothécènes. *Bull. Inst. Pasteur*, 88, 159-192.
- Viñas, I., Dadon, J., and Sanchis, V. (1993). Citrinin-producing capacity of *penicillium expansum* strains from apple packinghouses of Lerida (Spain). *Int.J.Food Microbiol.* 4, 79-82.
- Vineis, P., and Perera, F. (2000). DNA adducts as markers of exposure to carcinogens and risk of cancer. *Int.J.Cancer* 88, 325-328.
- Visconti, A., Haidukowski, EM., Pascale, M., Silvestri, M. (2004). Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicol Lett* 153, 181-189.
- Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, R., and Martlbauer, E. (2000). Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2483-2488.

## W

- Wagacha, JM., Muthomi, JW. (2008). Mycotoxin problem in Africa: Current status, implication to food safety and health and possible management strategies. *Food Microbiology*, 124 (1), 1-12.
- Wang, J. S., and Groopman, J. D. (1999). DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research* 424, 167-181.
- Wang, Y., Chai T., Lu, G., Quan, C., Duan, H., Yao, M., Zucker, B-A, Schlenker, G. (2008). Simultaneous detection of airborne aflatoxin, ochratoxin and zearalenone in a poultry house by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography. *Environ Res*; 107,139-44.
- Wang, H., Xue, C.Y., Chen, F., Ma, Y.L., Zhang, X.B., Bi, Y.Z., Cao, Y.C. (2009). Effects of combinations of ochratoxin A and T-2 toxin on immune function of yellow-feathered broiler chickens. *Poult. Sci.* 88, 504–510.
- Wang, D., Ma, Q, Zhang, N., and Qi, D.(2010). Genistein inhibit the proliferation induced by zearalenone in MCF-7 cells. *Molecular & Cellular Toxicology*.6 (1), 25-31.
- Wangikar, P.B., Dwivedi, P., Sharma, A.K., and Sinha, N. (2004). Effect in Rats of Simultaneous Prenatal Exposure to OchratoxinA and Aflatoxin B<sub>1</sub>.II.Histopathological Features of Teratological Anomalies Induced in Fetuses. *BirthDefectsResearch(PartB)*71, 352–358
- Wangikar, P.B., Dwivedi, P., Sinha, N., Sharma, A.K., Telang, A.G.(2005). Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B<sub>1</sub> with special reference to microscopic effects. *Toxicology* 215, 37-47.
- Watkins, J.B., and Klaassen, C.D. (1986). Xenobiotic biotransformation in liverstock: comparaison to other species commonly used in toxicity testing. *J. Anim. Sci.* 63, 933-942.
- Wegst, W., Lingens, F. 1983. Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiol. Lett.*, 17, 341-344.
- Weibking, T.S., Ledoux, D.R., Brown, T.P., & Rottinghaus, G.E. (1993 a) Fumonisin toxicity in turkey poult. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5, 75-83.
- Weinstein, I. B. (1988). The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Research* 48, 4135-4143.
- WHO. (1990). Selected Mycotoxins: Ochratoxin, Tricothecenes, Ergot. *Environmental Health Criteria No. 105*. Geneva: WH
- WHO. (2000). Environmental Health criteria N° 219, Fumonisin B<sub>1</sub> WHO, Geneva, International Program on Chemical Safety.
- WHO. (2002). Evaluation of certain mycotoxins in food, Technical report series 906, fifty-six report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, WHO, Geneva, International Program on Chemical Safety.
- WHO. (2002). Food additive series 44, Zearalenone, WHO, Geneva, International Program on Chemical Safety.

- Wicklow DT., and Shotwell, OL. (1983). Intrafungal distribution of aflatoxins among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Can J Microbial*, 29, 1-5.
- Williams, C. S., Mann, M., and DuBois, R. N. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 18, 7908-7916.
- Withanage, G.S., Murata, H., Koyama & T. Ishiwata, I. (2001). Agonistic and antagonistic effects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin on SKN, HHUA and HepG2 human cancer lines. *Vet. Hum. Toxicol.*, 43, 6-10.
- Wong, P.K., Hampton, M.J., and Floyd, R.A. (1982). Evidence for lipoxygenase-peroxydase activation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene by rat mammary gland, parenchymal cells. In: *Prostaglandins and cancer: first international conference*. Alan R. Liss, Inc, New York 167-179.
- Worrell, N.R., Mallett, A.K., Cook, W.M., Baldwin, N.C. and Shepherd, M.J. (1989). The role of gut micro-organisms in the metabolism of deoxynivalenol administered to rats. *Xenobiotica*, 19(1), 25-32.

## X

- Xiao, H., Marquardt, R.R. et al. (1995). Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* 43, 524-530.
- Xiao, H., Marquardt, R. R., Abramson, D., Frohlich, A., (1996a). Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 648-655.
- Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R. R., Li, S., Vodela, J.K., Frohlich, A.A., and Kemppainen, B.W. (1996b). Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone forms and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicolol Appl. Phram*, 137, 182-192.

## Y

- Yang, C.F., J. Liu, H.M. Shen and C.N. Ong. (2000). Protective effect of ebselen on aflatoxin B1- induced cytotoxicity in primary rat hepatocytes. *Pharm. and Toxic.* 86, 156-161.
- Yi, P.Y., Pai, C.K., and Liu, J.R. (2011). Isolation and characterization of a *Bacillus licheniformis* strain capable of degrading zearalenone. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (5). 1035-1043.
- Yiannikouris A., Jouany JP. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim. Res.* 51, 81-99.
- Yiannikouris, A., Poughon, L., Cameleyre, X., Dussap, C.G., François, J., Bertin, G., Jouany, J.P. (2003). A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotechnol. Lett.*, 25, 783-789.
- Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C-G., Bertin, G., Jeminet, G., Jouany J-P. (2004a). Alkali extraction of  $\beta$ -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties toward zearalenone. *J. Agr. Food Chem.*, 52, 3666-3673.
- Yiannikouris, A., André, G., Buléon, A., Jeminet, G., Canet, I., François, J., Bertin, G., Jouany, J-P. (2004b). Comprehensive Conformational Study of Key Interactions Involved in Zearalenone Complexation with  $\beta$ -D-Glucans. *Biomacromolecules*, 5 (6). 2176-2185.
- Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Jeminet, G., Bertin, G., Jouany, J.P. (2004c). Influence of pH on Complexing of Model  $\beta$ -D-Glucans with Zearalenone. *Journal of Food Protection* 67(12). 2741-2746.
- Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C-G., Bertin, G., Jeminet, G., and Jouany, J-P. (2004d). Complexation of zearalenone with  $\beta$ -D-Glucans isolate from the cell of *Saccharomyces cerevisiae*: study of the influence of pH on model  $\beta$ -D-Glucans, chapitre III, *Journal of food protection*.
- Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C-G., Bertin, G., Jeminet, G., and Jouany, J-P. (2004e). Adsorption of zearalenone by  $\beta$ -D-Glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall, chapitre II, *Journal of food protection*, 67( 6). 1195-1200.
- Yiannikouris, A. (thèse 2004). Etude des mécanismes chimiques impliqués dans la complexation de mycotoxines par les composants de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse doctorale de l'Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand.
- Yiannikouris, A., André, G., Poughon, L., François, J., Dussap, C-G., Jeminet, G., Bertin, G., and Jouany, J-P, (2006). Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with model  $\beta$ -D-Glucans. *Biomacromolecules*, 7, 1147-1153.
- Yoshimoto, T., Magata, K., Ehara, H., Mizuno, K., Yamamoto, S. (1986). Regional distribution of prostaglandin endoperoxide synthase studied by enzyme-linked immunoassay using monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 877(1), 141-150
- Yu, Z.L., Zhang, L.S., and Wu, D.S. (2005). Effects of zearalenone on proliferation and apoptosis in MCF-7 cells. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 39(5), 328-31

- Yu, Y., Qiu, L., Wu, H., Tang, Y., Lai, F., and Yu, Y. (2011). Oxidation of zearalenone by extracellular enzymes from *Acinetobacter* sp. SM04 into smaller estrogenic products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(11). 2675-2681.

## Z

- Zaghini, A., Sardi, L., Altafini, A., Rizzi, L. (2005a). Residues of aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in different biological matrices of swine orally administered aflatoxin B<sub>1</sub> and *Saccharomyces cerevisiae*. *ITAL.J.ANIM.SCI.* 4 (2), 488-490.
- Zaghini, A., Martelli, G., Roncada, P., Simioli, M., Rizzi, L. (2005b). Mannanooligosaccharides and aflatoxin B<sub>1</sub> levels in liver. *Poult Sci*, 84 (6), 825-832.
- Zaghini, A., Roncada, P., Patergnani, M., Bertaccini, G., Sardi, L., Rizzi, L. (2006). Levels of ochratoxin A in blood and tissues from swine orally dosed ochratoxin A, aflatoxin B<sub>1</sub> and *Saccharomyces cerevisiae*, *Vet. Pharm. Ther.*, 29 (1), 174-175.
- Zaied, C., Abida, S., Zorguib, L., Bouaziza, C., Chouchane, S., Jomaaa, M., Bacha, H. (2008). Natural occurrence of ochratoxin A in Tunisian cereals. *Food Control*.20, 1218-222
- Zimmerli, B., and Dick, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 666, 85-99.
- Zinedine, A. (2004 thèse). Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Thèse de l'université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Faculté des sciences Dhar El Mahrz. FES, Maroc.
- Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debgnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faïd, M., Benlemlih, M., Minardi, V., and Miraglia, M. (2006a). Natural occurrence of mycotoxins in cereals and species commercialised in Morocco, *Food Control*. 17, 11, 868-874.
- Zinedine, A., Gonzalez-Osnaya, L., Soriano, J.M., Molto, J.C., Idrissi, L., Manes, J. (2006b). Presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in pasteurized milk from Morocco. *Int. J. Food Microbiol.*, 114, 25-29.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C., Manes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone :An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1-18
- Zwierzchowski, W., Gajecki, M., Obremski, K., Zielonka, L., and Baranowski, M. (2004). The occurrence of zearalenone and its derivatives in standard and therapeutic feeds for companion animals. *Pol. J. Vet. Sci.*, 7, 289-293.

## Site Internet

- [www.alltech.com](http://www.alltech.com). INNOV SPACE 2007, Présentation des produits nouveaux en relation directe ou indirecte avec la production cunicole)
- [www.fao.org/docrep/005/y11390f02.html](http://www.fao.org/docrep/005/y11390f02.html)
- [www.mycored.eu/d/29/Mycotoxins/](http://www.mycored.eu/d/29/Mycotoxins/)

## Résumé :

Tout au long de la chaîne alimentaire, des moisissures peuvent se développer et produire des mycotoxines. Ce sont des composés toxiques naturels issus du métabolisme secondaire des moisissures, susceptibles de contaminer l'alimentation animale et humaine, provoquant de nombreuses pathologies (hépatotoxicité, néphrotoxicité, neurotoxicité, mutagénicité, tératogénicité, cancérogénicité,...).

La première étape de ce travail était d'évaluer la présence simultanée de l'ochratoxine A (OTA), de la citrinine (CIT), des aflatoxines (AFs), de la zéaralénone (ZEA), de la fumonisine (FB) et des trichothécènes dans des aliments destinés aux humains (céréales, lait, café, jambon) et aux animaux (croquettes de chat et chien, foin). En général plusieurs mycotoxines coexistaient. Certains échantillons pour les humains dépassaient les limites autorisées en mycotoxines dans l'Union Européenne. Suite à l'étude de simulation d'apport en mycotoxines dans une ration quotidienne, nous avons constaté que les doses journalières admissibles (DJA) peuvent être dépassées.

La deuxième phase consistait à étudier l'impact des mycotoxines seules ou en combinaison sur la viabilité cellulaire et la génotoxicité sur des modèles cellulaires (cellules rénales d'opossum (OK), cellules rénales humaines (HK2), cellules humaines de glandes mammaires (MCF7)) et chez des animaux (porc, rat). Nous avons montré que la CIT, la FB<sub>1</sub> et la ZEA agissent en synergie sur la génotoxicité de l'OTA. Chez les animaux, nous avons montré qu'à des doses (5 ng d'OTA/kg poids corporel/ jour et de 200ng FB<sub>1</sub>/kg pc/j) correspondantes aux DJA, il y avait des effets génotoxiques (formation d'adduits à l'ADN). Nous avons mis en évidence l'implication des mycotoxines dans l'alimentation animale sur la baisse de fertilité et la tératogénicité chez les chats, ainsi que sur la mort des chevaux.

Au cours de la troisième partie de cette étude, nous avons testé sur des cultures cellulaires (HK2 et MCF7) et *in vivo* (poulet) l'effet protecteur du glutathion (GSH) et de la sélénométhionine (SeMet) contre l'OTA responsable de cancers de voie urinaire et la ZEA responsable de baisse de fertilité. Le GSH est un puissant antioxydant et le sélénium est un oligoélément indispensable qui intervient comme co-facteur de nombreuses enzymes ayant des propriétés antioxydantes, comme les glutathion peroxydases. D'une manière générale, au niveau des cellules rénales, le GSH seul et la levure correspondante ont un effet bénéfique vis-à-vis de la génotoxicité de l'OTA ; par contre la sélénométhionine et la levure sélénée augmentent la génotoxicité de l'OTA et de la ZEA. Dans les cellules des glandes mammaires, il y a une nette amélioration vis-à-vis de la génotoxicité des deux mycotoxines lorsque les cellules sont exposées à une seule mycotoxine simultanément au GSH, à la sélénométhionine et aux levures enrichies. Chez les poulets, la diminution de la génotoxicité n'est pas exclusivement corrélée à la capacité des parois de levure ou des levures à adsorber l'OTA. Ces dérivés de levure ont gardé la propriété de partiellement métaboliser l'OTA dans l'intestin. Les parois de levures et les levures enrichies en GSH ont un meilleur pouvoir protecteur que celles enrichies en SeMet.

**Mots clés :** mycotoxines, génotoxicité, cytotoxicité, levures, glutathion, sélénométhionine, ochratoxine, zéaralénone, baisse de fertilité.

## Abstract:

Throughout the food chain, mold can grow and produce mycotoxins. These are toxic compounds "natural" from the secondary metabolism of molds that may contaminate the feed and food, causing many diseases (hepatotoxicity, nephrotoxicity, neurotoxicity, mutagenicity, teratogenicity, carcinogenicity, ...).

The first stage of this work was to assess the level of multi-contamination by mycotoxins (OTA, CIT, AFs, ZEA, FB, DON) in food (cereals, milk, coffee, ham) and feed (pet food). Some samples analyzed exceeded the limits of mycotoxins in the European Union. Through the simulation study of mycotoxin intake in a daily diet, we found that the acceptable daily intake (ADI) may be exceeded.

The second phase was to study the impact of mycotoxins alone or in combination on cell proliferation, genotoxicity in cellular models (OK, HK2, and MCF7) and animal (pig, rat). We have demonstrated genotoxic effects (formation of DNA adducts) at doses (5 ng OTA / kg bw / day and 200 ng FB<sub>1</sub>/kg bw / day) considered safe (ADI). We have shown that the CIT, FB<sub>1</sub> and ZEA act synergistically on the genotoxicity of OTA. We pointed to the involvement of mycotoxins in animal feed on declining fertility and teratogenicity in cats, as well as the death of horses.

In the third part of this study, we tested in cell cultures (HK2 and MCF7) and *in vivo* (chicken) the protective effect of glutathione (GSH) and selenomethionine (SeMet) against OTA responsible for urinary tract cancers and ZEA reducing fertility. GSH is considered as a potent antioxidant and selenium is a trace essential element that acts as a cofactor of enzymes such glutathione peroxidase. In summary, in kidney cells, GSH and GSH enriched yeast decrease OTA genotoxicity whereas SeMet and SeMet enriched yeast increase genotoxicity of OTA and ZEA. In mammary cells, whatever the compounds genotoxicity of OTA and ZEA significantly decrease. Decrease of OTA genotoxicity in chicken kidney cannot be exclusively explained by adsorption of OTA on yeast by products. The yeast products retain their ability to metabolize the OTA. GSH enriched yeast and yeast cell wells are more efficient than SeMet enriched yeast.

**Keywords:** mycotoxins, genotoxicity, cytotoxicity, yeast, glutathione, selenomethionine, ochratoxin, zearalenone reduced fertility

Lire  
la seconde partie  
de la thèse